



HAL
open science

Étude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs

Mathilde Royer

► To cite this version:

Mathilde Royer. Étude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs. Agronomie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0058 . tel-01749584

HAL Id: tel-01749584

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749584>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



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 Université de Lorraine – INRA
Laboratoire Agronomie & Environnement Nancy-Colmar
Ecole doctorale RP2E
« Ressources Procédés Produits Environnement »



THÈSE

Etude des relations entre croissance, concentrations
en métabolites primaires et secondaires et
disponibilité en ressources
chez la tomate avec ou sans bioagresseurs

Présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine
En Sciences Agronomiques**

Par

Mathilde ROYER

Soutenue publiquement le 22 Mai 2013 devant le jury composé de :

Mme M.-P. Prud'Homme	Professeur, Université de Caen	Rapporteur
Mr L. Urban	Professeur, Université d'Avignon	Rapporteur
Mr M. Bardin	Chargé de Recherche, INRA d'Avignon	Examinateur
Mr J. Le Bot	Chargé de Recherche, INRA d'Avignon	Examinateur
Mr C. Robin	Directeur de Recherche Université de Lorraine - INRA de Nancy	Directeur de thèse
Mr R. Larbat	Chargé de Recherche Université de Lorraine - INRA de Nancy	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je m'entends encore, à mon arrivée sur le plateau de Brabois, pour commencer mes études d'ingénieur à l'ENSAIA : « Bon, allez, deux ans et demi à tenir, et après, je retourne fissa dans ma Rhône-Alpes natale ». Cela fait maintenant 6 ans que j'ai migré dans le Grand Nord. Comme quoi, la vie est faite de surprises et d'opportunités !

Tout d'abord, je souhaite remercier **Mme Marie-pascal Prud'Homme**, professeur à l'université de Caen, **Mr Laurent Urban**, professeur à l'université d'Avignon et **Mr Marc Bardin**, chargé de recherche à l'INRA d'Avignon, d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie **Frédéric Bourgaud**, directeur du laboratoire Agronomie-Environnement, de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire, **Christophe Robin** et **Romain Larbat** de m'avoir encadrée durant ces 3 ans, tant dans les expérimentations que dans la structuration de mon projet de thèse.

Je souhaite également remercier le département Environnement et Agronomie de l'INRA et la Région Lorraine pour avoir financé ce travail.

Durant ma dernière année de thèse, j'ai dû me rendre quelques semaines en Avignon pour aller rejoindre mes tomates. Le choc thermique fut rude, mais les membres de l'équipe PSH m'ont toujours accueillie avec gentillesse. **Jacques Le Bot**, **Stéphane Adamowicz**, je vous remercie de m'avoir fait partager votre expertise scientifique durant entre autre mon comité de thèse, la rédaction de mon premier article ou les différentes réunions ou visio-conférence que nous avons pu partager. **Jacques**, merci pour l'organisation de mes séjours ; **Stéphane**, un grand merci pour votre aide dans les nombreux scripts statistiques. **José**, **Guillaume**, **Valérie**, je vous remercie de l'aide pour l'organisation et la gestion des cultures à Avignon. Sans vous, cela aurait été dur d'organiser tout cela à 500 km de distance. Je remercie enfin toutes les personnes qui ont pu venir nous donner un coup de main pour les récoltes, ou juste passer voir qui étaient ces gens du Grand Nord venu faire pousser des tomates en Avignon.

Je tiens à remercier, ensuite, les personnes des différents laboratoires, qui ont collaboré avec nous sur les expérimentations sur les bioagresseurs. Je pense notamment à **Nicolas Desneux** de l'INRA d'Antibes, qui, par son expertise scientifique sur les insectes, nous a permis d'amorcer un projet de recherche sur *Tuta absoluta*, à **Philippe Nicot** et **Manzoor Ali Abro** pour leur gentillesse et leur disponibilité lors de l'inoculation et de la notation des symptômes de *Pseudomonas* et *Botrytis*. Sans votre aide, nous n'aurions pas pu réaliser cette série d'expérimentation.

Je remercie également **Mr Philippe Vivin**, chargé de recherche à l'INRA de Bordeaux, d'avoir accepté de participer à mon comité de thèse.

Je souhaite également remercier **Cédric Paris**, qui a analysé (et re-analysé parfois !) mes nombreux voire très nombreux échantillons en LC-MS, pour son aide et sa gentillesse. Je voudrais également remercier **Patrick Gross** qui a supervisé le bon fonctionnement des serres

à l'INRA de Champenoux et **Stéphanie Ouvrard** qui nous a gentiment aidés pour les dosages en chromatographie ionique.

Durant mes trois années de thèse, j'ai pu également enseigner aux étudiants de deuxième année option Agronomie de l'IUT Nancy-Brabois. Je remercie **Françoise Lasserre**, ma tutrice, pour son soutien malgré son emploi du temps chargé et tous les autres enseignants de l'option avec qui j'ai pu échanger, pour leur conseil sur l'enseignement.

Je tiens à remercier tout le personnel du laboratoire Agronomie & Environnement pour leur présence et leur soutien, et en particulier : **Thamara**, merci pour votre patience pour l'organisation de mes innombrables déplacements à Avignon pas toujours très simples, **Claude**, merci pour votre soutien technique qui m'a permis de réaliser la première culture hydroponique de tomates en serre de l'équipe, les « **PAT Girls** », merci pour les discussions diverses et variées de midi en salle café.

Les J.C., je ne vous oublie pas : **Simon, Aline, Célia, Nico, Sissi, Estelle, Flore, Guilhem, Abdelhak, Fazeelat**, merci pour votre soutien, pour les innombrables discussions, et pour les coups de gueule (on la fera un jour notre révolution) ! **Flore**, merci d'avoir coordonné l'organisation de cette fameuse J.J.C. Sans toi, cela n'aurait pas été pareil et je suis fier d'avoir participé et d'avoir partagé cette aventure avec vous tous ! **Simon**, merci de m'avoir sauvé plus d'une fois quelques journées de prise de tête sur les scripts de R !

Merci à **Emile Benizri** de m'avoir, encore plus, donné le goût de la recherche, et pour avoir toujours eu, au gré des rencontres dans les couloirs, un petit mot d'encouragement ou simplement un sourire pour moi. Qui sait, peut-être, dans quelques années, lors d'un cours à mes étudiants, je me dirai : « Ah, Emile avait raison ! ».

Je suis sûre que vous êtes en train de vous dire : « Mais elle l'a oubliée ! ». Mais comment pourrais-je oublier de la remercier. **Aude**, UN GRAND MERCI pour ton soutien autant technique que moral durant ces 3 années (plutôt 3 et demi !). Sans toi, je n'aurais jamais vu le bout de toutes ces analyses. Et d'autant plus important, je n'aurais jamais pu survivre à tout ce stress, ces questionnements, ces prises de décisions sans ton soutien. Merci pour ta gentillesse, ta patience (envers toutes mes questions, parfois je l'avoue, parfaitement idiotes), ton soutien sans faille et pour ta bonne humeur face à mon pessimisme.

Les derniers remerciements seront pour ma famille qui a très vite compris que les questions concernant l'avancement de ma thèse n'étaient pas les bienvenues lors des réunions de famille. Merci à **Papa** et **Maman** de m'avoir soutenue et supportée durant mes études, d'avoir toujours été là pour moi et de croire en moi quoi que je fasse. Merci à mon frère **Simon** de toujours me redonner le sourire voire de me faire rire aux éclats même dans les périodes les plus dures. Merci à **Laura** pour tes longs mails toujours salvateurs durant les journées laborieuses de rédaction. Et puis une petite pensée pour tant d'autres : **Mémé, Sébastien, Virginie et Antoine, Hélène et Christian, Patrick et Jeanine, Pauline...** Que ce fut agréable de s'échapper de tout ce stress pour quelques week-ends avec vous !

Je tiens à remercier également ma belle-famille. J'ai découvert une famille, certes différente de la mienne, mais toujours accueillante et aimante. **Jean-Pierre** et **Annie**, **Karl** et **Nat**, **Sonia** et **Fabrice**, **Nico** et **Caro**, merci pour votre soutien. Une petite pensée pour **Lucas** qui m'a permis de m'évader dans des activités beaucoup plus terre à terre (♪ Petit Papa Noël ♪) !

Je finirai par remercier mon « chou » qui partage ma vie depuis maintenant 4 ans et a pu voir mon évolution au fur et à mesure de l'avancée de ma thèse. Ah, je t'en ai fait voir de toutes les couleurs ! Malgré tout, tu m'as toujours soutenue et je t'en remercie. Merci pour les dimanches passés à m'aider à m'occuper de mes tomates. Merci pour les relectures de mails, articles, présentations... Merci pour tes conseils et aussi pour tes coups de gueule. Tu as toujours été là pour moi. Maintenant, c'est mon tour, et je ferai mon possible pour te soutenir durant ta thèse.

Je voudrais dédier ce manuscrit à mon grand père, décédé en octobre 2010. **Pépé**, j'aurai bien voulu que tu me voies docteur. J'espère que, de là où tu es, tu es fier de moi. Des nombreux voyages en France avec Mémé et toi, j'en ai gardé le goût de toujours vouloir découvrir plus loin, une certaine ouverture d'esprit et je vous en remercie. J'ai beaucoup appris à tes côtés même si nous n'étions parfois pas d'accord dans notre vision de la vie.

On dit souvent : « Une vie qui s'éteint, c'est toujours une autre vie qui commence ». Je souhaite donc la bienvenue au petit **Hugo** (qui est devenu un petit garçon de 2 ans maintenant). Tu as suivi ma thèse, même encore dans le ventre de ta maman (extractions, pesées, broyage...). Qui sait, peut-être que tu seras un grand scientifique ! En tout cas, j'espère que ta vie sera aussi longue et heureuse que celle qu'a vécue mon grand-père. Et, je pense que c'était sa devise, ne laisse jamais personne décider de ta vie !

TABLE DES MATIERES

<i>Abréviations</i>	1
INTRODUCTION	3
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Agriculture et durabilité des systèmes agricoles	6
1.1. Notion d'intensification écologique	6
1.2. Stimulation des défenses naturelles : nouvelle stratégie alternative de lutte contre les bioagresseurs	6
2. Les mécanismes de défense des plantes	8
2.1. Défense constitutive	8
2.1.a. Les barrières structurales	8
2.1.b. Les molécules phytoanticipines : barrières chimiques constitutives.....	8
2.2. Mécanismes de défense inductibles.....	8
2.2.a. Séquence des événements conduisant à l'induction de défense des plantes lors d'une interaction plante-pathogène	8
2.2.b. La réponse hypersensible (HR) : réponse locale à l'infection	9
2.2.c. Le renforcement de la paroi cellulaire : mécanisme de défense physique	9
2.2.d. La résistance systémique acquise (RSA): réponse systémique à l'infection	9
3. Les principaux métabolites secondaires impliqués dans la défense	11
3.1. Les composés phénoliques	11
3.1.a. Biochimie	11
3.1.a.i. Les acides phénoliques.....	13
3.1.a.ii. Les flavonoïdes	13
3.1.a.iii. Les lignines	14
3.1.a.iv. Composés phénoliques présents chez la tomate.....	14
3.1.b. Localisation et rôle de défense	15
3.2. Les glycoalcaloïdes	16
3.2.a. Biochimie	16
3.2.a.i. Les glycoalcaloïdes présents chez la tomate	17
3.2.b. Localisation et rôle de défense	18
3.3. Autres composés secondaires impliqués dans la défense de la plante.....	19
3.3.a. Les furocoumarines	19
3.3.b. Les composés organiques volatils (COV)	20
3.3.c. Les alcaloïdes	21
3.3.d. Les glucosinolates	22
4. Métabolismes primaire et secondaire reliés à la disponibilité en ressources C et N	24
4.1. L'azote et le carbone : éléments indispensables pour la plante	24
4.1.a. L'azote, nutriment essentiel et molécule signal	24
4.1.b. Le carbone : composant indispensable des molécules végétales	27
4.1.c. Relation entre métabolismes du carbone et de l'azote.....	29
4.2. Dilemme pour la plante : partage des ressources entre les deux métabolismes.....	30
5. Influence combinée de la disponibilité en ressources et de l'attaque de bioagresseurs sur le compromis entre métabolismes	32
5.1. Les principaux bioagresseurs de la tomate	33
5.1.a. Insectes	33
5.1.b. Champignons	35

5.1.c.	Bactéries	37
5.2.	La relation entre disponibilité en azote, comportement du bioagresseur et réponse de la plante dépend du type de bioagresseur et du statut azoté de la plante	39
6.	Le modèle tomate.....	42
7.	Objectifs de ma thèse	43
	CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	45
1.	Matériel végétal utilisé	46
2.	Dispositifs de culture.....	46
2.1.	Dispositif de culture en serre à l'INRA de Champenoux	46
2.1.a.	Description du dispositif de germination.....	46
2.1.b.	Description du dispositif de culture hydroponique	47
2.1.c.	Facteurs étudiés : fertilisation azotée et concentration en CO ₂ atmosphérique.....	48
2.1.d.	Préparation des solutions nutritives	49
2.1.e.	Contrôle des conditions de culture	50
2.1.f.	Méthode d'échantillonnage	50
2.2.	Dispositif de culture en phytotron à l'INRA d'Avignon	51
2.2.a.	Description du dispositif de germination.....	51
2.2.b.	Description du dispositif de culture hydroponique	52
2.2.c.	Facteurs étudiés : fertilisation azotée et présence de bioagresseurs.....	53
2.2.c.i.	Expérimentation sur les bactéries <i>Pseudomonas syringae</i> et <i>Pseudomonas corrugata</i> ...	53
2.2.c.ii.	Expérimentation sur l'insecte <i>Tuta absoluta</i>	54
2.2.c.iii.	Expérimentation sur le champignon <i>Botrytis cinerea</i>	54
2.2.d.	Préparation des solutions nutritives	55
2.2.e.	Contrôle des conditions de culture	55
2.2.f.	Méthode d'inoculation des bioagresseurs.....	56
2.2.f.i.	Méthode d'inoculation d'une suspension de bactérie <i>Pseudomonas</i>	56
2.2.f.ii.	Méthode d'inoculation d'œufs de <i>Tuta absoluta</i>	56
2.2.f.iii.	Méthode d'inoculation d'une suspension de spores de <i>Botrytis cinerea</i>	58
2.2.g.	Mesures des échanges gazeux foliaires	58
2.2.h.	Protocole d'échantillonnage	59
2.2.h.i.	Echantillonnage de l'expérimentation « <i>Pseudomonas</i> ».....	59
2.2.h.ii.	Echantillonnage de l'expérimentation « <i>Tuta absoluta</i> ».....	60
2.2.h.iii.	Echantillonnage de l'expérimentation « <i>Botrytis cinerea</i> »	61
3.	Analyses réalisées	62
3.1.	Dosage du carbone et de l'azote totaux dans les tissus végétaux	62
3.2.	Dosage du nitrate et de l'ammonium dans les tissus végétaux.....	62
3.3.	Analyse des composés primaires.....	63
3.3.a.	Extraction et dosage des glucides simples (glucose, fructose, saccharose)	63
3.3.b.	Extraction et dosage de l'amidon	64
3.4.	Analyse de l'expression des gènes de biosynthèse et des concentrations en polyphénols et tomatine.....	64
3.4.a.	Dosage de l'expression de gènes de la voie des phénylpropanoïdes	64
3.4.b.	choix de la méthode d'extraction combinée des polyphénols et glycoalcaloïdes	65
3.4.c.	Extraction et analyse des polyphénols et glycoalcaloïdes des échantillons issus des expérimentations.....	65
3.4.d.	Extraction et dosage de la lignine.....	68
4.	Analyses statistiques.....	69

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....	71
<i>Partie 1 : le ratio C/N des tissus : variable indicatrice du partage des ressources entre les deux métabolismes ?.....</i>	72
1. Matériel et méthodes (rappels).....	72
2. Contrôle des paramètres de culture.....	73
2.1. Conditions de l'environnement	73
2.2. Suivi et ajustements des solutions nutritives	74
3. Effet des traitements CO₂ et N sur les paramètres de croissance	75
3.1. Production de biomasse totale et surface foliaire	75
3.2. Echanges gazeux foliaires	77
3.3. Consommation d'eau et de nitrate	77
4. Teneurs en C et N dans les différentes parties de la plante	79
4.1. Evolution de la concentration en azote ([N]) et en carbone ([C]) total des différents tissus à 27, 35 et 47 jours après semis	79
4.2. Etablissement du ratio C/N total : obtention d'une gamme de C/N par les différents traitements	82
4.3. Relation entre le ratio C/N et la production de biomasse	83
5. Teneurs en glucides simples et amidon.....	83
5.1. Teneurs en glucides en fonction du ratio C/N	83
5.2. Teneurs en amidon en fonction du ratio C/N	84
6. Teneurs en métabolites de défense en fonction du ratio C/N total.....	85
6.1. Principaux polyphénols	85
6.2. Cas d'un glycoalcaloïde : la tomatine	86
7. Teneurs en lignine en fonction du ratio C/N	87
8. Relation entre les teneurs en métabolites et les ratios C/N des structures et des ressources	88
8.1. Trois ratios C/N différents : ratio C/N total, des structures et des ressources	88
8.2. Corrélations entre les teneurs en métabolites et les ratios C/N des structures et des ressources ...	90
9. Impact de la forme d'azote sur les métabolismes primaire et secondaire.....	92
10. Discussions	92
10.1. Les traitements ont affectés la croissance et la concentration en métabolites primaires en cohérence avec la littérature	92
10.2. Les composés de défense basés sur le carbone et l'azote sont positivement corrélés au ratio C/N...	93
10.3. La forme d'azote influence les concentrations en acide chlorogénique	94
10.4. Les concentrations en lignine ne sont pas corrélées au ratio C/N, quel que soit l'organe considéré.	95
10.5. Restreindre le ratio C/N au pool des structures ou des ressources ne modifie pas les corrélations	95
11. Conclusions.....	96

Partie 2 : Effets de la présence de bioagresseurs sur la croissance et les concentrations en principaux métabolites primaires et secondaires en fonction de la disponibilité en azote	97
1. Matériels et méthodes (rappels)	98
2. Etude de deux pathosystèmes tomate – bactérie : <i>Pseudomonas syringae</i> et <i>Pseudomonas corrugata</i>	99
2.1. Effet de l'inoculation et de la disponibilité en azote sur les paramètres de croissance et les échanges gazeux	99
2.1.a. Biomasse sèche et surfaces foliaires	99
2.1.b. Echanges gazeux foliaires	100
2.2. Ratio C/N, concentrations en métabolites et expressions de gènes clés dans la zone infectée	101
2.2.a. Ratio C/N des tissus infectés	101
2.2.b. Concentrations en métabolites primaires et secondaires dans la zone inoculée	102
2.2.c. Expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes et des phénolamides	107
2.3. Ratios C/N et concentrations en métabolites primaires et secondaires dans la feuille « systémique » et les tiges	110
2.3.a. Ratio C/N	110
2.3.b. Concentrations en métabolites primaires et secondaires	111
2.4. Effet de la disponibilité en azote sur l'expression des symptômes de <i>P. corrugata</i> et <i>P. syringae</i>	117
3. Etude d'un ravageur <i>Tuta absoluta</i>	121
3.1. Effet de <i>Tuta absoluta</i> et de la disponibilité en azote sur les paramètres de croissance	121
3.2. Ratio C/N et concentrations en métabolites primaires et secondaires dans la feuille infectée	122
3.3. Effet de la disponibilité en azote sur <i>Tuta absoluta</i> et sur la création de galeries	124
4. Discussion	125
4.1. La réponse des plantes aux traitements azotés, similaire pour les trois études, est cohérente avec les résultats de notre étude en serre et avec la littérature	125
4.2. L'inoculation des bactéries pathogènes étudiées (<i>P. syringae</i> et <i>P. corrugata</i>) modifie le métabolisme des glucides dans les heures qui suivent l'infection	125
4.3. <i>P. syringae</i> élicite la synthèse de caffeoyl putrescine, reliée à une forte induction de l'expression des gènes SIPHT 1 et 2	126
4.4. <i>P. syringae</i> induit un changement dans la répartition des ressources au sein de la voie des phénylpropanoïdes.....	127
4.5. L'herbivorie par <i>T. absoluta</i> induit une faible réponse de la plante dans nos conditions expérimentales	128
4.6. <i>Botrytis cinerea</i> ne s'est pas développé de manière satisfaisante dans nos conditions expérimentales	128
4.7. Le comportement du bioagresseur aux traitements azotés et la réponse du plant de tomate sont spécifiques du bioagresseur	129
5. Conclusions	131
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	133
Références bibliographiques.....	137
Liste des figures	147
Liste des tableaux	154
ANNEXES	159

Abréviations

[C]_{total} : concentration en carbone total
[CO₂] : concentration en dioxyde de carbone
[N]_{total} : concentration en azote total
1N : normalité de la solution
4CL : 4-coumarate CoA ligase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ARN : acide ribonucléique
ATP : adénosine triphosphate
BTH : benzothiadiazole
C : carbone
C/N_r : ratio C/N des ressources
C/N_s : ratio C/N des structures
C4H : cinnamate 4 hydroxylase
Ca²⁺ : ion calcium
CHS : chalcone synthase
CNB : carbone/nutriment balance : équilibre carbone/nutriment
COV : composés organiques volatils
DMAPP : diméthylallyl diphosphate
FD : feuilles développées
FED : feuilles en développement
GDB : growth differentiation balance : équilibre entre croissance et différenciation
GOGAT : glutamate synthase
GS : glutamine synthétase
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HC : [CO₂] enrichi
HCAA : amides des acides hydroxycinnamiques ou phénolamides
HN : high nitrogen : niveau d'azote pléthorique
HR : réponse hypersensible
hr : humidité relative
II^{re} : secondaire
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
IPP : isopentenyl diphosphate
I^{re} : primaire
JAS : jours après semis
KR : kaempferol-rutinoside
LC : [CO₂] ambiant
LN : low nitrogen : niveau d'azote limitant
MEP : méthylerythritol phosphate
MF : matière fraîche
mM : mmol.l⁻¹
MS : masse sèche

MVA : acide mévalonique
N : azote
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAR : nitrate réductase
NFT : nutriment film technique
NH₄⁺ : ammonium
NIR: nitrite réductase
N_{mix} : apport d'azote sous forme mélange nitrate/ammonium
N_{nit} : apport d'azote sous forme nitrate seul
NO₂⁻ : nitrite
NO₃⁻ : nitrate
ODT : théorie de défense optimale
OGM : organisme génétiquement modifié
OH : groupement hydroxyle
PAL : phénylalanine ammonia-lyase
PAR : radiation photosynthétiquement active
PCM : modèle de compétition des protéines
PCR : polymérase chain reaction
Protéines PR : protéines « pathogenesis related » : protéines « liées à la pathogénie »
Pv : pathovar
PVPP : polyvinylpomypyrrolidone
R : racines
Ratio C/N : ratio carbone/azote
ROS : espèces réactives de l'oxygène
RQ : quantité relative
RSA : résistance systémique acquise
SDN : stimulateur de défense naturelle
Sl : *Solanum lycopersicum*
T : tiges
UV : ultra-violet

INTRODUCTION

Ecophyto 2018, mis en place au Grenelle de l'Environnement (2008), est un plan qui vise à réduire l'utilisation des pesticides de 50% si possible, d'ici à 2018. Ces dernières années, la société a opéré une sérieuse prise de conscience des effets néfastes des pesticides sur l'environnement (qualité des eaux, des sols...) et la santé, c'est pourquoi ce plan a été adopté. Dans ce contexte de limitation de l'utilisation des pesticides, l'agriculture doit créer de nouveaux systèmes agricoles pour répondre aux différentes attentes croissantes de la société. Le modèle dominant en Europe d'agriculture « intensive » a été conçu pour maximiser la production de nourriture. Mais une demande émerge afin que les systèmes agricoles puissent aussi contribuer de façon plus importante à d'autres services, qualifiés d'« écosystémiques » et utiles au bien-être public, comme la séquestration de carbone, la pollinisation ou l'épuration des eaux... Ceci amène à la notion d'intensification écologique : la voie vers la production maximisée de produits agricoles et de services écosystémiques grâce à des moyens de production plus respectueux de l'environnement. Dans le domaine particulier de la santé des plantes, l'agriculture doit se tourner vers d'autres moyens alternatifs de luttés contre les bioagresseurs, tout en maintenant de forts rendements culturaux.

Les recherches sur ces méthodes alternatives sont nécessaires. Les luttés biologique (lâcher d'auxiliaires, confusion sexuelle par phéromones) et physique (binage, allongement de rotation) sont des techniques développées concrètement sur le terrain. Des méthodes novatrices de stimulation des défenses naturelles de la plante se mettent également en place. En effet, les attaques de bioagresseurs sont parées par de nombreux mécanismes dont l'accumulation de composés biochimiques de défense (tels que les polyphénols ou les glycoalcoïdes) antimicrobiens et/ou anti-insectes. Ce mécanisme peut être induit par l'attaque d'un bioagresseur, mais est aussi constitutif. La plante possède des composés de défense, dont les concentrations peuvent augmenter localement ou de façon systémique pour rendre les tissus plus résistants aux attaques ultérieures.

Plusieurs méthodes de stimulation des défenses de la plante se développent, notamment par le biais de l'utilisation de stimulateurs des défenses naturelles (SDN). L'application de ces molécules d'origine animale, végétale, minérale ou de synthèse permet à la plante d'enclencher ses mécanismes de défense et d'acquérir un état de résistance vis-vis des bioagresseurs (ex : les harpines, protéines bactériennes - Messenger[®], la laminarine issu des algues brunes - Iodus 2[®]).

Une autre voie de recherche se développe pour produire des plantes génétiquement transformées sur-exprimant des enzymes clés de voies de biosynthèse des composés de défense et contenant une teneur accrue en certains composés (Niggeweg *et al.*, 2004). Mais l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM) en agriculture est controversée et cette solution se voit confrontée à la réticence de la société vis-à-vis des OGM.

La composition en molécules de défense peut être aussi modifiée par les conditions environnementales (Dumas *et al.*, 2003), en particulier celles qui sont plus ou moins maîtrisables dans les systèmes de production. En effet, une intensité lumineuse forte ou une

limitation de la fertilisation azotée induisent une augmentation des teneurs en flavonoïdes et composés phénoliques (Dixon et Paiva, 1995; Stout *et al.*, 1998). Néanmoins, la production de molécules de défense (issues du métabolisme secondaire) entre en compétition pour les ressources carbonées et azotées avec la croissance (métabolisme primaire). En faisant écho à la notion d'intensification écologique, à l'échelle de la plante, une croissance intensive est nécessaire pour que la plante soit compétitive alors que la défense est basée sur la synthèse accrue de métabolites secondaires. La plante est face à un dilemme, croître ou se défendre (Mittelstraß *et al.*, 2006). Un compromis est donc créé pour l'allocation des ressources.

De nombreuses théories ont été développées sur ce compromis. Elles explicitent le partage des ressources entre les deux métabolismes (Herms et Mattson, 1992; Gayler *et al.*, 2008). Bien que ces théories soient couramment citées dans le domaine de la défense des plantes, il existe peu de données expérimentales illustrant ce compromis.

Dans ce manuscrit, nous commençons par une analyse bibliographique exposant les connaissances générales nécessaires pour éclairer et justifier les objectifs de ce travail. Les matériels et méthodes seront ensuite établis. Puis les résultats seront présentés et discutés. Une discussion générale exposant les principales conclusions et les perspectives viendra clore ce manuscrit.

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette analyse bibliographique, j'apporte des connaissances générales sur les mécanismes de défense de la plante, les principaux métabolites secondaires et leur rôle dans la défense. Ensuite, j'expose l'effet de la disponibilité de ressources azotées et carbonées sur le partage entre la croissance et la défense et je montre l'importance du ratio C/N pour ce compromis. Enfin, je détaille les connaissances sur les effets de la présence de bioagresseurs sur cette relation entre ressources et métabolismes, primaire et secondaire. Je termine cette bibliographie en explicitant le choix de notre modèle d'étude : la tomate.

1. Agriculture et durabilité des systèmes agricoles

1.1. Notion d'intensification écologique

Au Moyen-âge, les systèmes de culture de céréales intercalées de périodes de jachères ont dominé. Ces jachères permettaient de maîtriser les adventices, et de casser le cycle des pathogènes. Néanmoins, ces systèmes ont montré des limites que l'on connaît, du fait de la non-utilisation du sol lors des périodes de jachère qui entraînait des pertes d'azote par lessivage. Les systèmes de cultures continues, qui ont succédé aux systèmes à jachères à partir du 16^{ième} siècle, ont permis, avec l'utilisation d'une grande diversité d'espèces cultivées, de mieux utiliser les capacités des sols. Des prairies temporaires ainsi que des cultures de légumineuses fourragères sont entrées dans les rotations. La pression des adventices et des bioagresseurs a été limitée par l'alternance d'espèces cultivées différentes. Ceci a constitué la première intensification écologique de l'agriculture. Néanmoins, ce système s'est essoufflé et n'a pas pu produire suffisamment pour une population en accroissement (Papy et Goldringer, 2011). En France, les exploitations étaient petites, et la place manquait. Dans la deuxième moitié du 20^{ième} siècle, pour accroître la production et les rendements, les systèmes agricoles sont devenus des systèmes intensifs à forts usages d'intrants. Les plantes sont devenues fragiles (sensibles à la verse...) par l'utilisation accrue de fertilisants azotés. L'usage des pesticides a diminué la pression accrue des adventices et des bioagresseurs, ce qui a permis à la sélection variétale de se tourner vers l'amélioration des rendements en quantité et en qualité technologique. Les variétés récentes sont beaucoup moins résistantes aux bioagresseurs que les variétés ancestrales (Papy et Goldringer, 2011). L'usage des pesticides a créé des effets néfastes pour l'environnement (pollution des eaux et des sols) et pour la faune agricole nécessaire (auxiliaires, ver de terre...). L'usage de ces produits a même conduit à l'apparition de résistances chez les adventices et bioagresseurs, ce qui les rend, à terme, inutiles pour la protection des plantes cultivées (Papy et Goldringer, 2011).

Aujourd'hui, la prise de conscience de la société sur les effets environnementaux et sanitaires néfastes d'une utilisation accrue d'intrants remet en cause l'agriculture intensive. Cette prise de conscience appelle donc un changement de nos systèmes de production vers une intensification écologique. L'intensification est plus que jamais nécessaire car la population mondiale s'accroît et les surfaces agricoles deviennent de plus en plus limitées et concurrencées par les zones urbaines. Mais les systèmes devront être en harmonie avec l'environnement (Bonny, 2010). En effet, ces systèmes peuvent fournir d'autres services écosystémiques que le seul but de fournir des produits agricoles (séquestration de carbone, filtration d'eau...) (Doré *et al.*, 2011).

1.2. Stimulation des défenses naturelles : nouvelle stratégie alternative de lutte contre les bioagresseurs

L'objectif est donc de réduire les intrants sans réduire les rendements. Cet objectif est celui du plan Ecophyto 2018, à la suite du Grenelle de l'environnement. Ce plan vise à réduire l'utilisation des produits phytosanitaires de 50% si possible, d'ici à 2018, tout en maintenant un niveau de production agricole élevé. Ceci impose à l'agriculture de se tourner vers des

stratégies alternatives de protection contre les bioagresseurs. La recherche est ainsi mise à contribution pour développer et/ou améliorer de telles méthodes. Une des pistes est de stimuler les défenses naturelles des plantes. Il existe actuellement trois stratégies différentes :

- La première est la création de plantes génétiquement modifiées à forte teneur en composés de défense. En effet, des plantes, dont la production et l'accumulation de composés secondaires sont favorisées par la sur-expression d'un ou de plusieurs gènes impliqués dans leur voie de biosynthèse, peuvent présenter une résistance accrue à l'attaque de pathogènes, notamment bactériens (Niggeweg *et al.*, 2004; Bovy *et al.*, 2007). Néanmoins, cette voie de recherche utilisant des OGM rencontre dans plusieurs pays dont la France, des problèmes d'acceptation par la société.
- Une deuxième voie de recherche utilise des SDN. Des avancées récentes sur la compréhension de l'enchaînement des mécanismes de défense de la plante ont permis de découvrir et de potentiellement utiliser des molécules élicitrices pour induire une réponse de défense de la plante. Ces molécules peuvent être naturelles (extraits de microorganismes ou d'algues...) ou synthétiques (benzothiadiazole (BTH) mimant l'acide salicylique, méthyl jasmonate...) (Boughton *et al.*, 2006). Ces auteurs ont montré que l'application foliaire de BTH sur des plants de tomate affectait la croissance d'une population de pucerons (*Mizus persicae*) par diminution de sa fécondité. Selon Thaler (1999), l'application d'acide jasmonique sur tomate diminue l'abondance de nombreux herbivores tels que certains pucerons (*Myzus persicae*) ou des thrips (*Frankliniella occidentalis*). Certains de ces éliciteurs sont commercialisés mais cette catégorie de produits ne possède pas de norme d'homologation spécifique et les SDN n'ont pas réellement montré leur réelle efficacité de protection souvent partielle et aléatoire en condition de production.
- L'action des facteurs environnementaux (lumière, nutrition hydrique, nutrition minérale...) est une troisième stratégie visant à stimuler les mécanismes de défense de la plante et à accumuler des composés de défense. En effet, la production de ces composés est non seulement affectée par des facteurs génétiques mais aussi par des facteurs environnementaux (Dumas *et al.*, 2003). Un grand nombre de composés de défense (comme les phénylpropanoïdes ou les terpénoïdes) sont moins concentrés dans des plantes ombrées (Dixon et Paiva, 1995; Roberts et Paul, 2006). Les teneurs en phénylpropanoïdes sont plus fortes dans des plantes de pomme de terre limitées en azote (Mittelstraß *et al.*, 2006) avec comme conséquence une meilleure résistance à *Phytophthora infestans* mais une plus grande sensibilité à l'infection par *Alternaria solani*. Ces résultats montrent que l'action de l'environnement est contrastée puisqu'il peut modifier les teneurs en composés de défense des plantes et donc faire varier leur résistance. Contrairement à l'utilisation de SDN, l'action des itinéraires culturaux est encore au stade de recherche.

Il en résulte que certains composés secondaires sont impliqués dans des mécanismes de défense. Ces mécanismes doivent donc être mieux décrits pour comprendre la place que prennent ces métabolites dans la défense des plantes.

2. Les mécanismes de défense des plantes

2.1. *Défense constitutive*

2.1.a. Les barrières structurales

Ce sont les premières barrières que les bioagresseurs rencontrent, avant le contact avec les parois cellulaires. La cuticule, recouvrant les premières couches de cellules au niveau de l'épiderme, en est la structure la plus efficace. Certaines structures à la surface des feuilles peuvent empêcher l'adhésion ou la germination de bactéries ou d'œufs d'insectes. Par exemple, les trichomes, poils épidermiques, pointus ou en crochet, peuvent piéger les insectes ou leurs œufs (Benhamou, 2009).

2.1.b. Les molécules phytoanticipines : barrières chimiques constitutives

Les cellules végétales produisent de nombreux composés qui leur permettent de se protéger contre les attaques de bioagresseurs. Ces molécules sont produites continuellement, même en l'absence de bioagresseurs. Elles sont appelées phytoanticipines et regroupent les composés phénoliques, les alcaloïdes, les saponines... faisant partie des métabolites secondaires. Ces phytoanticipines, contrairement aux phytoalexines, sont des composés synthétisés dans la plante saine et dont la production peut être stimulée par une attaque de bioagresseurs, à partir de molécules déjà présentes dans la plante (Van Etten *et al.*, 1994). Ces composés antimicrobiens ou anti-herbivores, sont soit stockés sous forme inactive et activés suite à l'attaque, soit séquestrés dans un compartiment cellulaire et libérés lors de la décompartmentation des cellules liée à l'attaque (Benhamou, 2009; Reisdorf-Cren, 2012). Ils agissent directement en bloquant la croissance du bioagresseur ou indirectement en inhibant certaines des enzymes utilisées pour pénétrer dans la plante (Macheix *et al.*, 2005). L'effet de défense de ces molécules peut être renforcé par une augmentation des teneurs après une attaque de bioagresseurs (Scheel, 1998; Macheix *et al.*, 2005).

2.2. *Mécanismes de défense inductibles*

2.2.a. Séquence des évènements conduisant à l'induction de défense des plantes lors d'une interaction plante-pathogène

La reconnaissance entre les deux protagonistes (plante et pathogène) *via* des interactions au niveau des surfaces cellulaires est la première étape essentielle. Cette interaction mène à l'émission d'éliciteurs : signaux chimiques qui se fixent sur des récepteurs membranaires et enclenchent les mécanismes de défense chez la plante (Figure 1, N°1). Les mécanismes intervenant dès les premières minutes après le contact avec un micro-organisme sont des perturbations membranaires créant une augmentation de la teneur en calcium dans la cellule (Benhamou et Picard, 1999). Les ions Ca^{2+} , souvent considérés comme des messagers secondaires, transmettent le signal par l'activation de protéines kinases et les phosphorylations en cascade responsables de l'activation des gènes de défense et donc du déclenchement des mécanismes de défense (Poovaiah *et al.*, 1993; Benhamou et Picard, 1999; Adam, 2008).

2.2.b. La réponse hypersensible (HR) : réponse locale à l'infection

La réponse hypersensible est un phénomène de mort programmée des cellules du site d'infection, ce qui permet de freiner la progression de l'agent pathogène (Hammond-Kosack et Jones, 1996; Adam, 2008). Cette HR est associée au « burst » oxydatif, caractérisé par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : H₂O₂, superoxide). Ce burst oxydatif permet de catalyser le renforcement des barrières physiques et il est impliqué dans le signal des mécanismes de défense plus tardifs (activation des gènes codant pour les protéines « liées à la pathogénie » (PR), inhibiteurs de protéase...; Figure 1, N°3).

Le phénomène de HR est accompagné par une libération, au cours de la désagrégation des compartiments cellulaires, de composés de défense préformés (Hammond-Kosack et Jones, 1996; Scheel, 1998). Cette mort programmée des cellules est typiquement active lors de l'attaque par des pathogènes biotrophes (Pieterse *et al.*, 2009).

2.2.c. Le renforcement de la paroi cellulaire : mécanisme de défense physique

L'accumulation de calcium dans la cellule et le *burst* oxydatif jouent un rôle dans l'activation du renforcement des barrières physiques contre les pathogènes. Un des renforcements des parois apparaissant le plus rapidement lors de l'infection est la formation de papilles : protubérances hémisphériques entre la paroi cellulaire et la membrane au niveau du site de pénétration du pathogène. Cet épaissement de la paroi cellulaire bloque physiquement la pénétration fongique (Hammond-Kosack et Jones, 1996; Benhamou et Picard, 1999; Collinge, 2009). Un dépôt de callose apparaît dans les parois cellulaires près du site d'infection (Hammond-Kosack et Jones, 1996). L'augmentation de la teneur en calcium est une des voies d'activation d'une enzyme impliquée dans la formation de callose (Figure 1, N°2) (Hammond-Kosack et Jones, 1996; Benhamou et Picard, 1999). Le blocage des plasmodesmes grâce à un dépôt de callose est un constituant important des mécanismes de défense contre les mouvements de virus de cellule en cellule (Hammond-Kosack et Jones, 1996). Enfin, un phénomène plus lent qui rend les parois cellulaires encore plus imperméables est l'augmentation des teneurs en lignine et subérine localement (Hammond-Kosack et Jones, 1996). Ces mécanismes physiques, ralentissant la pénétration du pathogène, permettent à la plante d'activer les autres voies de biosynthèse de molécules à action antimicrobienne directe (protéines PR, phytoalexines...) (Figure 1, N°4) (Benhamou, 1996). La différence entre les phytoalexines et les phytoanticipines n'est pas basée sur leur structure chimique mais plutôt sur la manière dont elles sont produites (Van Etten *et al.*, 1994). En effet, les composés phytoalexines sont synthétisés et accumulés dans la plante après l'attaque d'un bioagresseur, à partir de précurseurs non existants au préalable dans la plante (Mert-Türk, 2002). Leur production implique le plus souvent une synthèse *de novo* d'enzymes (Osborn, 1996). Ils sont, comme les protéines PR ou les agents oxydants, des composants d'une batterie de mécanismes de défense induite (Mert-Türk, 2002).

2.2.d. La résistance systémique acquise (RSA): réponse systémique à l'infection

Les mécanismes de défense mis en place ne se limitent pas à la proximité du site d'infection. La plante développe une réponse systémique, état de résistance généralisé, qui permet de la protéger contre des attaques ultérieures de bioagresseurs. Cet état, proche de l'immunité

animale, apparait quelques heures après la reconnaissance plante-pathogène et implique la diffusion du signal aux cellules saines à l'aide de messagers secondaires (Benhamou, 2009) (Figure 1, N°5). De nombreuses publications ont montré que l'acide salicylique joue un rôle de messenger secondaire dans la mise en place de la RSA (Malamy *et al.*, 1990; Ryals *et al.*, 1996). Mais il partagerait ce rôle avec l'éthylène et l'acide jasmonique (Benhamou, 2009). La diffusion de ces messagers secondaires induit l'activation de gènes de défense et la production d'une diversité de composés issus du métabolisme secondaire, comme des protéines de défense et divers phytoalexines (Ryals *et al.*, 1996; Benhamou, 2009). Ces molécules ont un rôle antimicrobien direct.

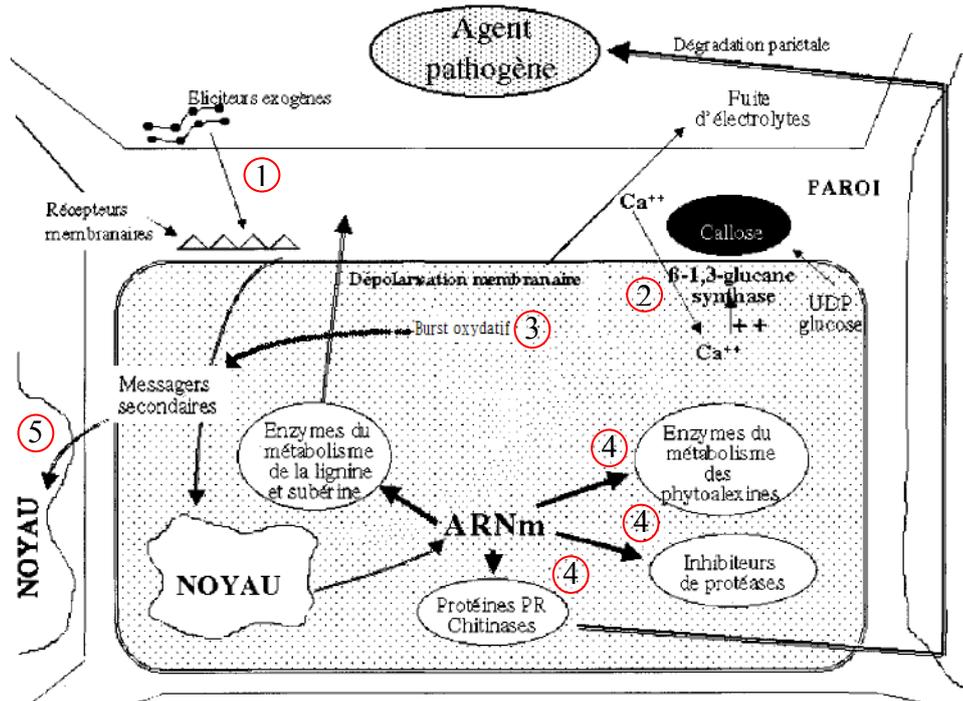


Figure 1: Schéma simplifié des principaux mécanismes physiques et biochimiques de défense de la plante en réponse à l'infection – 1 : Reconnaissance des deux protagonistes par émission d'éliciteurs – 2 : Dépolarisation membranaire et augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule permettant d'activer une enzyme impliquée dans la formation de callose, barrière physique – 3 : la réaction d'hypersensibilité s'accompagne d'un burst oxydatif fournissant des messagers secondaires pour l'activation des mécanismes de défense plus tardifs – 4 : Activation de gènes de défense permettant d'activer la synthèse de phytoalexines, protéases, chitinases – 5 : Production de messagers secondaires (acide jasmonique, acide salicylique...) et diffusion dans toute la plante pour activer une résistance systémique à l'infection. D'après Benhamou et Picard (1999).

3. Les principaux métabolites secondaires impliqués dans la défense

Le métabolisme primaire regroupe toutes les voies de synthèse de composés indispensables à la croissance et au développement de la plante. Les métabolites primaires qui en proviennent ont donc un rôle clé et bien établi chez tous les végétaux (acides aminés et protéines, acides gras, sucres et polysaccharides...). Par opposition, le métabolisme secondaire regroupe les autres voies de synthèse de composés qui ne sont pas directement impliqués dans la croissance de la plante. Les métabolites secondaires interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement (soutien, protection contre les UV, défense, mise en place de symbiose, attraction d'insectes utiles pour la pollinisation...). Certains de ces composés participent à la défense contre les bioagresseurs (Herms et Mattson, 1992) et ce rôle nous intéresse particulièrement ici. Nous commencerons par détailler la grande famille des composés phénoliques, regroupant la plupart des composés carbonés de défense (flavonoïdes, acides phénoliques...) présents chez de nombreux végétaux. Ensuite, nous aborderons les glycoalcaloïdes, famille de molécules composées de carbone et d'azote, présentes chez les Solanacées et fortement associées à la défense des plantes. Enfin, nous décrirons brièvement les autres composés de défense tels que les furocoumarines, les composés organiques volatils (COV, dont le site d'action ne se situe pas dans les tissus de la plante, mais dans l'atmosphère après évaporation depuis le site de production), les alcaloïdes et les glucosinolates. Toutes ces molécules sont considérées comme des phytoanticipines.

3.1. Les composés phénoliques

3.1.a. Biochimie

Les composés phénoliques (ou polyphénols) regroupent plusieurs milliers de molécules caractérisées chez les végétaux (Albrecht *et al.*, 1999; Clé *et al.*, 2008). Ils possèdent tous un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH⁻) (Macheix *et al.*, 2005; Benhamou, 2009).

Les composés phénoliques peuvent se regrouper en plusieurs classes selon la complexité du squelette carboné, le degré de modification de ce squelette (méthylation, hydroxylation...) et les liaisons possibles avec d'autres molécules (lipides, protéines, autres métabolites) (Tableau 1).

Squelette carboné	Nom du groupe
C_6	Phénols simples
C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques
C_6-C_3	Acides phénoliques
C_6-C_4	Naphtoquinones
$C_6-C_2-C_6$	Stilbènes
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes
$(C_6-C_3)_n$	Lignines
$(C_{15})_n$	Tannins

Tableau 1: Les différents groupes de composés phénoliques. D'après Macheix *et al.* (2005).

La plupart des composés phénoliques sont issus de deux acides aminés essentiels : la phénylalanine et dans une moindre mesure la tyrosine (surtout impliquée chez les monocotylédones). Ces acides aminés sont synthétisés à partir de la voie de l'acide shikimique. Les précurseurs sont des sucres issus du cycle des pentoses et du cycle de Calvin (Benhamou, 2009).

La première étape de la biosynthèse des composés phénoliques est la désamination de la phénylalanine catalysée par l'enzyme clé phénylalanine ammonia-lyase (PAL). En résulte la synthèse de l'acide cinnamique qui est hydroxylé, réaction catalysée par la cinnamate 4 hydroxylase (C4H), pour former l'acide *p*-coumarique, principal précurseur de la majorité des composés phénoliques (Figure 2).

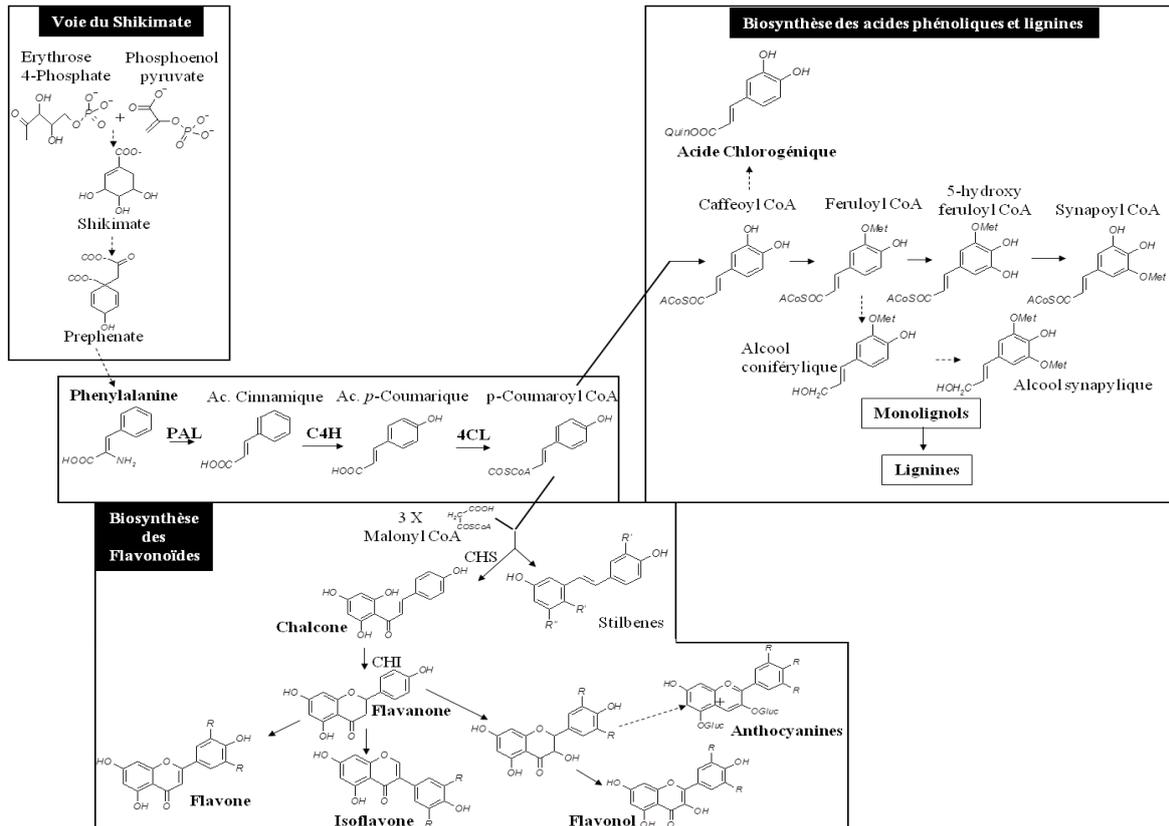


Figure 2: Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des composés phénoliques. PAL : phénylalanine ammonia-lyase. C4H : cinnamate 4 hydroxylase. 4CL : 4-coumarate CoA ligase. CHS : chalcone synthase. CHI : chalcone isomérase.

3.1.a.i. Les acides phénoliques

L'acide *p*-coumarique est transformé en *p*-coumaroyl CoA, réaction catalysée par l'enzyme 4-coumarate CoA ligase (4CL). De cette molécule, par hydroxylation, méthylation et réduction, se créent de nombreux composés : acides férulique, sinapique et caféique par exemple. Ces acides phénoliques sont très souvent sous forme conjuguée à d'autres molécules organiques. Impliquant la fonction carboxylique, la conjugaison de ces acides phénoliques avec du glucose ou différents alcools-acides (acides quinique, malique...) crée des esters. L'ester d'acide caféique avec l'acide quinique est l'acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique), l'ester d'acide caféique le plus fréquemment rencontré (Macheix *et al.*, 2005; Morot-Gaudry, 2012). Leur conjugaison avec des mono ou des di-amines (tyramine, putrescine...) conduit à des phénolamides (ou des amides des acides hydroxycinnamiques : HCAA). Ces HCAA sont la conjugaison des acides hydroxycinnamiques (tels que l'acide *p*-coumarique ou l'acide férulique) avec des polyamines (tels que la tyramine, la putrescine, l'octopamine...).

3.1.a.ii. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont définis par leur squelette de base constitué de deux cycles aromatiques à 6 atomes de carbone connectés entre eux par un hétérocycle à 3 atomes de carbone (C6-C3-C6) (Bovy *et al.*, 2007). Selon les modifications de l'hétérocycle, ces composés sont regroupés en divers sous-groupes incluant les anthocyanidines, les flavonols, les flavones, les flavanols, les flavanones, les chalcones, les isoflavonoïdes (Treutter, 2006). Leur synthèse

débuté par la formation de *p*-coumaroyl CoA catalysée par la 4-coumarate-CoA ligase (4CL) à partir de l'acide *p*-coumarique. A cette molécule de *p*-coumaroyl-CoA sont ajoutés 3 molécules de malonyl-CoA aboutissant à la formation d'une chalcone (Figure 3) catalysée par l'enzyme chalcone synthase (CHS) (Morot-Gaudry, 2012).

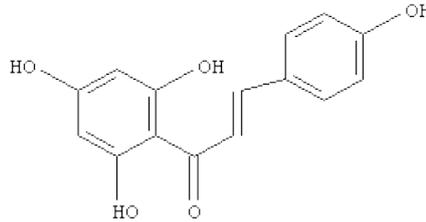


Figure 3: Molécule de chalcone, premier composé produit dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes

3.1.a.iii. Les lignines

Les lignines résultent d'une polymérisation d'alcools cinnamyliques : les monolignols (alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique). Ces monolignols dérivent du *p*-coumaroyl-CoA par une série de réactions impliquant des hydroxylases, des Co-A ligases, des méthylases, des réductases et des déshydrogénases. Les lignines sont des molécules de fin de chaîne de la voie de biosynthèse des composés phénoliques.

La lignine est indispensable au maintien des plantes et donc à leur développement. Par ailleurs, cette molécule découle de la voie de biosynthèse des composés phénoliques et est, par sa présence dans les parois cellulaires, le premier rempart aux attaques de bioagresseurs. De ce fait, son caractère primaire ou secondaire est difficile à définir (Macheix *et al.*, 2005). Son rôle actif dans la défense des plantes est souvent remis en question.

3.1.a.iv. Composés phénoliques présents chez la tomate

Le fruit étant la partie consommable d'un plant de tomate, de nombreux articles ont étudié sa composition en métabolites secondaires. Outre le fait que la tomate est la plus importante source de lycopène, de nombreux composés phénoliques ont été détectés dans ce fruit (Slimestad et Verheul, 2005). Fleuriet et Macheix (1981) ont montré que l'acide chlorogénique (ester de l'acide caféique avec l'acide quinine – Figure 4.A) était un des dérivés d'acide hydroxycinnamique prédominant durant la croissance et la maturation du fruit de tomate. Plus récemment, Raffo *et al.* (2002) et Sánchez-Rodríguez *et al.* (2012) ont aussi montré que, parmi les phénols simples, le composé principal était l'acide chlorogénique. Sa teneur moyenne dans les fruits est de 0.7 mg/100 g de masse fraîche (Slimestad et Verheul, 2005).

Les flavonoïdes sont produits essentiellement dans la peau (Bovy *et al.*, 2007). Les principaux flavonoïdes détectés dans les fruits de tomate sont une chalcone : la naringénine-chalcone et un flavonol glycosylé : la rutine (quercétine-3-rhamnosylglucoside –Figure 4.B) (Slimestad et Verheul, 2005; Bovy *et al.*, 2007; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). La rutine, seul flavonol glycosylé détecté de façon régulière dans les échantillons, voit sa teneur varier de 0.3 à 0.9 mg/100 g de masse fraîche (Slimestad et Verheul, 2005). Des flavonoïdes mineurs sont

identifiés dans le fruit de tomate tels que le flavonol glycosylé kaempferol-3-rutinoside (Figure 4.C) (Slimestad et Verheul, 2005; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

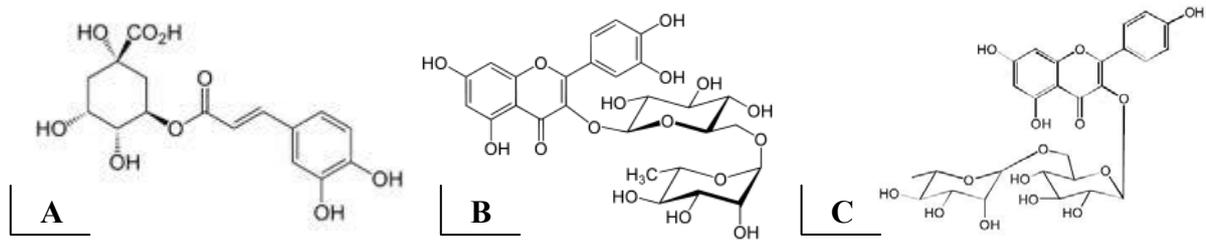


Figure 4: Molécule d'acide chlorogénique (A.), de rutine (B.) et de kaempferol-rutinoside (C.)

Moco *et al.* (2006) ont créé une base de données identifiant les métabolites secondaires prédominants dans le fruit. Dans cette base, nous retrouvons l'acide chlorogénique, la rutine et le kaempferol-rutinoside. Ces trois composés sont les principales molécules observées dans les extraits de feuille de tomate (Bénard, 2009; Le Bot *et al.*, 2009). L'acide chlorogénique est le composé phénolique majeur dans les feuilles (2% de masse sèche). Les teneurs en rutine et en kaempferol-rutinoside varient respectivement de 0.3 à 0.6% de masse sèche et 0.2 à 0.5% de masse sèche. Dans les racines, l'acide chlorogénique est le composé phénolique majeur détecté (Larbat *et al.*, 2012a).

3.1.b. Localisation et rôle de défense

Les composés phénoliques sont des substances toxiques pour la plante. On les retrouve dans des zones où leur accumulation est sans danger pour les cellules végétales qui les produisent. Ils sont sous formes inactive ou conjuguée avec des sucres ou des acides aminés (Benhamou, 2009). Leurs localisations principales à l'échelle de la cellule sont la vacuole où sont présents tous les composés hydrophiles et les parois où se retrouvent la lignine et les différentes formes liées aux structures lipidiques (Macheix *et al.*, 2005).

Leur localisation à l'échelle de la plante dépend essentiellement de leur fonction. Par exemple, les anthocyanes et les flavonols des feuilles sont répartis plutôt dans les épidermes, du fait de leur rôle de protection contre les UV.

L'effet négatif de l'acide chlorogénique sur la croissance des insectes ravageurs a été montré (Traugott et Stamp, 1997). Ce composé a été décrit comme anti-appétant et réducteur de digestibilité contre différents insectes incluant des insectes broyeur comme les chenilles ou les chrysomèles et des insectes piqueurs suceurs comme les thrips ou les pucerons. La rutine a aussi un rôle de protection contre les insectes ravageurs (tels que les punaises) (Traugott et Stamp, 1997). L'acide chlorogénique montre aussi des effets négatifs sur la croissance des champignons tels que *Phytophthora capsicii*, ou des bactéries telles que *Pseudomonas syringae* (Nuringtyas *et al.*, 2012). En effet, Niggeweg *et al.* (2004) ont montré que les plants de tomate génétiquement modifiés contenant des teneurs élevées en acide chlorogénique présentaient une progression plus faible et un niveau réduit d'infection par *P. syringae* pv *tomato*. Des résultats similaires ont été observé chez le tabac contenant différentes teneurs en acide chlorogénique, infecté par le pathogène *Cercospora nicotianae* (Maher *et al.*, 1994; Shadle *et al.*, 2003).

Les composés phénoliques regroupent les acides phénoliques, les flavonoïdes, les lignines... Ils sont tous issus d'une première réaction de désamination catalysée par une enzyme clé de cette voie : la PAL. Dans le plant de tomate, l'acide chlorogénique et la rutine sont les principaux polyphénols présents. Leurs pouvoirs antimicrobiens et antifongiques ont été souvent démontrés dans des études *in vitro*. Ils possèdent aussi des pouvoirs répulsifs contre les insectes. Certaines études *in planta* ont montré que des plantes à fortes teneurs en composés de défense possédaient un niveau réduit d'infection pour certains bioagresseurs (tels que *P.syringae*). Néanmoins, la relation entre les concentrations en composés de défense et un niveau d'infection faible n'a jamais été formellement prouvée. En effet, les teneurs en composés de défense ne sont qu'une partie des nombreux mécanismes de défense de la plante.

3.2. Les glycoalcaloïdes

3.2.a. Biochimie

Les glycoalcaloïdes sont des molécules comprenant un stéroïde lié à une chaîne glucidique par un groupement OH sur le carbone en position 3 (Friedman, 2004). Ils sont communément présents dans les plantes du genre *Solanum* : pomme de terre (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), aubergine (*Solanum melongena*)...

Les stéroïdes sont des dérivés des triterpènes. Ils consistent en un squelette de cholestane (27 atomes de carbone) avec un atome d'azote incorporé dans le cycle F (Milner *et al.*, 2011). Leur élaboration nécessite la polymérisation d'unités isopréniques et la cyclisation de l'ensemble (Morot-Gaudry, 2012). Ils représentent la partie non glucidique (aglycone) des glycoalcaloïdes.

La deuxième unité structurale des glycoalcaloïdes est une chaîne glucidique attachée au groupement hydroxyle en position 3 du cycle A de l'aglycone. Ce polysaccharide consiste en différentes combinaisons de glucose, galactose, xylose et rhamnose formant des tri- ou tetra-saccharides (Milner *et al.*, 2011).

En exemple, dans l' α -tomatine, l'aglycone est la tomatidine. Elle est liée à une chaîne glucidique (lycotetraose) composée d'une unité de xylose, d'une unité de galactose et de deux unités de glucose (Figure 5) (Friedman, 2002).

L'aglycone stéroïde représente la partie hydrophobe alors que la chaîne glucidique représente celle hydrophile. Le groupement NH représente la partie polaire de la molécule (Friedman, 2002).

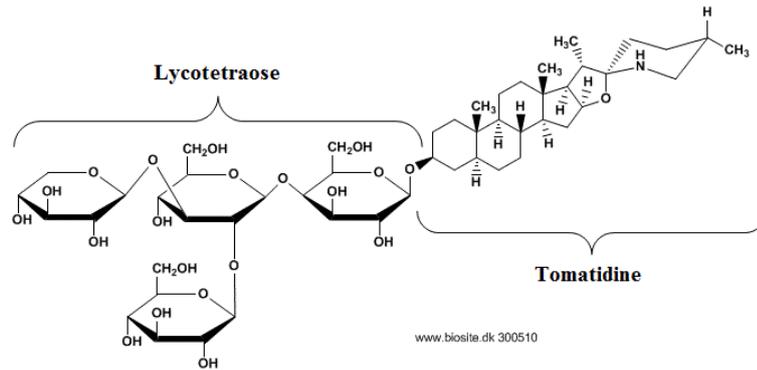


Figure 5: Représentation de la molécule d' α -tomatine composée d'un stéroïde la tomatidine lié par un groupe OH à une chaîne glucidique lycotetraose.

Le point de départ de la biosynthèse des glycoalcaloïdes est le cholestérol (Figure 6). Néanmoins, la totalité des réactions de cette voie de biosynthèse n'a pas encore été élucidée. La Figure 6 montre une voie de biosynthèse possible des glycoalcaloïdes.

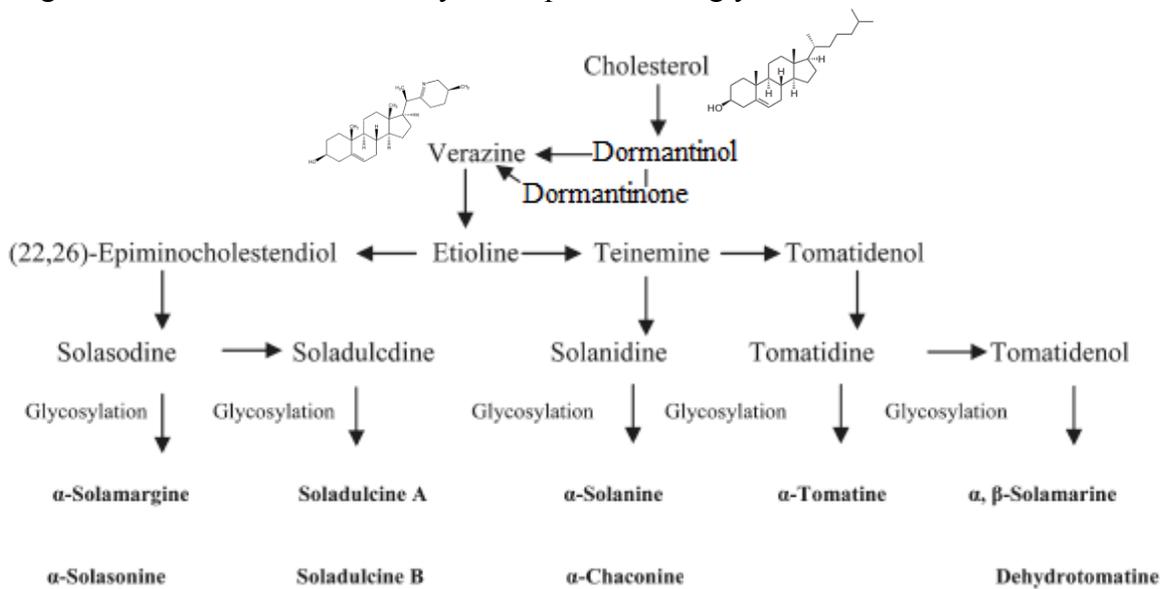


Figure 6: Schéma d'une voie de biosynthèse possible des principaux glycoalcaloïdes dérivés du cholestérol – d'après Milner *et al.* (2011)

3.2.a.i. Les glycoalcaloïdes présents chez la tomate

L' α -tomatine (Figure 5) ainsi que la déhydrotomatine apparaissent chez la tomate. La déhydrotomatine diffère de l' α -tomatine seulement par la présence d'une double liaison entre les atomes de carbone 5 et 6 du cycle B (Figure 7).

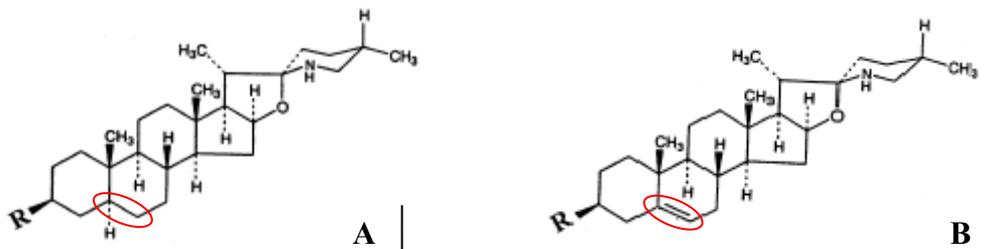


Figure 7: Représentation des composés α -tomatine (A) et déhydrotomatine (B) différant seulement par une double liaison entourée en rouge – d'après Friedman (2002)

Ces composés sont présents dans tous les organes du plant de tomate. Les teneurs en α -tomatine peuvent atteindre plus de 5% de la matière fraîche (MF) dans les feuilles, les fleurs et les fruits immatures (Hoffland *et al.*, 1999) mais cette concentration chute à 5 ppm dans la MF des fruits rouges. Ce composé est dégradé lors de la maturation des fruits (Friedman, 2002). Kozukue *et al.* (2004) ont établi un classement des tissus les plus concentrés en α -tomatine : fruits immatures > fleurs > feuilles > tiges > racines.

Trois autres glycoalcaloïdes ont été isolés par Yahara *et al.* (1996) dans les feuilles et fruits de tomate mais à des concentrations très inférieures à celles de la tomatine. Leurs teneurs dans les fruits de tomate vont de 1.5 à 5 ppm dans la MF comparés à 1100 ppm pour la tomatine. Ce sont des dérivés de la tomatine contenant un groupement acetoxy ($\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-}$ ou OAc) sur le cycle F (Figure 8).

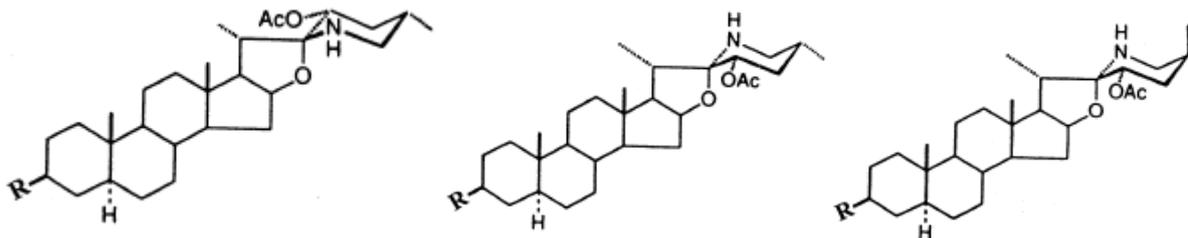


Figure 8: Représentation des 3 glycoalcaloïdes dérivés de la tomatine isolés par Yahara *et al.* (1996) dans les feuilles et les fruits de tomate – OAc est le groupement acétoxy qui les différencie de la tomatine.

3.2.b. Localisation et rôle de défense

L' α -tomatine est toxique pour une large gamme d'organismes présentant des stérols membranaires (Hoffland *et al.*, 2000a). En effet, l'un de ces modes d'action est l'interaction avec ces stérols qui cause la perturbation des membranes fongiques (Keukens *et al.*, 1995; Hoffland *et al.*, 2000a).

L' α -tomatine est un puissant antifongique et un composé insecticide (Van Baarlen *et al.*, 2004). Cette molécule montre une toxicité envers de nombreux champignons pathogènes tels que *Botrytis cinerea* (Hoffland *et al.*, 1999) ou *Cladosporium fulvum* (Friedman, 2002).

Néanmoins, certains champignons dont *Septoria lycopersici*, *Alternaria tomato* et *Botrytis cinerea*, produisent des tomatinases capables de dégrader l' α -tomatine en clivant un résidu glucidique pour former un composé moins toxique la β_1 -tomatine (Quidde *et al.*, 1998; Friedman, 2002; Benhamou, 2009).

Les glycoalcaloïdes sont largement présents dans les plantes de la famille des Solanacées. Ils sont composés d'un stéroïde lié à une chaîne glucidique. Alors que la solanine est présente en grande quantité dans la pomme de terre, l' α -tomatine apparaît chez la tomate. Ce glycoalcaloïde est un puissant antifongique et un composé insecticide. Néanmoins, comme pour les polyphénols, ces pouvoirs toxiques contre les bioagresseurs sont souvent décrits *in vitro*. De plus, certains champignons produisent des enzymes leur permettant de détoxifier l' α -tomatine.

3.3. Autres composés secondaires impliqués dans la défense de la plante

3.3.a. Les furocoumarines

Comme les flavonoïdes et les acides phénoliques, les coumarines découlent de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Les coumarines peuvent être classées, en fonction de la complexité de leur structure, en simples coumarines, furocoumarines (ou coumarines 7-oxygéné), ou pyranocoumarines. Nombre de ces molécules sont utilisées en médecine et cosmétique (Bourgaud *et al.*, 2006).

Une molécule de coumarine et une molécule de furane constituent la structure des furocoumarines. Selon la position du noyau furane sur la coumarine, on distingue deux types : linéaire où le cycle furane est attaché en C₆-C₇ et angulaire où le cycle furane est attaché en C₇-C₈ (Figure 9). L'umbelliférone est la molécule précurseur des furocoumarines. La première réaction est sa prénylation en position 6 pour les furocoumarines linéaires et en position 8 pour les angulaires (Bourgaud *et al.*, 2006). Les enzymes cytochrome P450 sont intimement liées à la voie de biosynthèse des furocoumarines. Elles sont considérées comme des enzymes pivot.

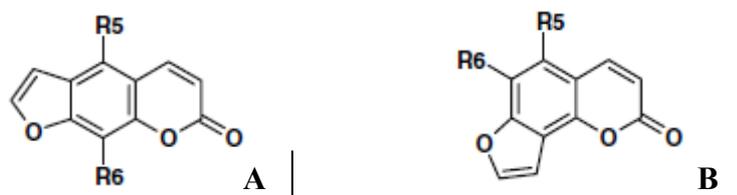


Figure 9 : Structure type d'une furocoumarine linéaire (A.) et angulaire (B.) – La variabilité de R5 et R6 permet de différencier les molécules – D'après Bourgaud *et al.* (2006)

Alors que les furocoumarines linéaires (psoralène, xanthotoxine, bergaptène et isopimpinelline pour les plus abondantes) sont principalement retrouvées dans quatre familles de plantes : les apiacées, moracées, rutacées et fabacées, les angulaires (angélicine, sphondine et pinpinelline pour les plus abondantes) sont moins répandues et sont uniquement retrouvées chez les apiacées et fabacées.

Leur capacité à s'insérer dans l'ADN et l'ARN, en créant des liens covalents avec la thymidine principalement, leur confère un rôle de composé toxique en réponse à une infection fongique ou à une blessure causée par un insecte (Bajaj, 2001; Hehmann *et al.*, 2004; Bourgaud *et al.*, 2006). Ce procédé de liaison est photodépendant et bloque la réplication et la transcription de l'ADN. Les furocoumarines linéaires possèdent donc une forte génotoxicité envers les organismes vivants (tels que les insectes). Quant aux furocoumarines angulaires, elles possèdent simplement la capacité de former des adduits avec l'ADN créant moins de dommages que les linéaires. Seuls les herbivores capables de tolérer les furocoumarines peuvent se nourrir des plantes riches en ces composés (Bourgaud *et al.*, 2006).

De par leur activité photodépendante, elles sont de plus en plus utilisées dans le domaine thérapeutique (traitement de la sclérose en plaques, photothérapie pour les tumeurs résistantes aux autres traitements, photochimiothérapie contre les maladies de la peau) (Bajaj, 2001; Bourgaud *et al.*, 2006).

3.3.b. Les composés organiques volatils (COV)

Les COV sont des composés odorants synthétisés par de nombreuses espèces de plantes puis émis dans l'atmosphère (Degenhardt *et al.*, 2010). Ces molécules lipophiles possédant un faible point d'ébullition et une forte pression de vapeur représentent plus de 1% des métabolites secondaires (Dudareva et Pichersky, 2008). Plus de 1700 COV ont été isolés dans plus de 90 familles de plantes. Ces composés peuvent être divisés en quatre classes majeures : les terpénoïdes, les phénylpropanoïdes/benzoïdes, les dérivés des acides gras et les dérivés des acides aminés.

Les terpénoïdes composent une large gamme de métabolites secondaires avec de nombreux représentants volatils. En effet, les hémiterpènes (C_5), de nombreux monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les homoterpènes (C_{11} et C_{16}) et de nombreux diterpènes (C_{20}) possèdent une pression de vapeur élevée leur permettant d'être vaporisés dans l'atmosphère. Tous les terpénoïdes sont issus d'un précurseur à 5 carbones : isopentenyl diphosphate (IPP) et de son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP). Deux voies de biosynthèse distinctes permettent de produire ces deux précurseurs. Dans le cytosol, l'IPP est synthétisé avec 3 molécules d'acétyl CoA par la voie de l'acide mévalonique (voie du MVA), alors que dans les plastes, il est dérivé du pyruvate et du glycéraldéhyde-3-phosphate *via* la voie du méthylerythritol phosphate (voie du MEP).

Les phénylpropanoïdes et benzoïdes, dérivés de la phénylalanine, constituent une large gamme de composés volatils. Néanmoins, peu d'informations sont disponibles sur la voie de biosynthèse de ces phénylpropènes. La première étape est la conversion de la phénylalanine en acide cinnamique. Dans les étapes suivantes, divers acides hydroxycinnamiques, aldéhydes et alcools sont formés à partir de l'acide cinnamique et certains de ces intermédiaires peuvent être convertis en composés volatils.

Les dérivés d'acides gras, tels que le trans-2-hexenal, le cis-3-hexenol et le méthyljasmonate constituent une autre classe de composés volatils. Ils sont dérivés des acides gras insaturés en C_{18} comme l'acide linoléique ou l'acide linoléique.

Alors que les phénylpropanoïdes/benzoïdes sont issus de la phénylalanine, d'autres acides aminés tels que l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine et la méthionine peuvent servir de précurseurs pour des composés volatils sous forme d'aldéhydes, d'alcools...

Ces COV sont émis par les fleurs, feuilles et fruits dans l'atmosphère et par les racines dans le sol. Leur fonction est de défendre la plante contre les insectes ravageurs et les pathogènes, d'attirer les pollinisateurs, et d'autres animaux ou micro-organismes bénéfiques (Dudareva et Pichersky, 2008). Alors que certains composés sont produits par des plantes non attaquées (composés constitutifs) et stockés dans des trichomes glandulaires, l'action combinée des dégâts mécaniques et des éliciteurs des insectes ravageurs stimule l'émission passive de composés constitutifs en cassant les trichomes et induit l'émission *de novo* de composés volatils (Dudareva *et al.*, 2006; Degenhardt *et al.*, 2010). Par exemple, selon la variété de tomate, les composés terpénoïques constitutifs émis par la plante sont le β -phellandrène, le δ -carène ou encore le β -caryophyllène. Lors de l'attaque par un insecte ravageur, le

monoterpène β -ocimène est communément induit par l'herbivorie (Degenhardt *et al.*, 2010). En réponse à l'attaque d'un insecte ravageur, la plante émet un mélange de composés volatils pouvant dépasser les 200 composés (Dudareva et Pichersky, 2008). Les fleurs et les feuilles sont les principaux contributeurs du pool de composés volatils émis par la plante (Raghava *et al.*, 2010).

3.3.c. Les alcaloïdes

De tous les composés secondaires végétaux connus, environ 20% sont classés comme alcaloïdes (Verpoorte *et al.*, 1993; Nugroho *et al.*, 2002). Environ 20% des espèces de plantes à fleurs produisent ces alcaloïdes et chacune les accumule en fonction d'un modèle unique et prédéfini (Croteau *et al.*, 2000).

Dans leur définition originelle, les alcaloïdes sont des composés végétaux pharmacologiquement actifs contenant de l'azote. De nos jours, cette définition n'est pas suffisamment complète pour englober tous les groupes d'alcaloïdes, mais elle peut être toujours appropriée dans de nombreux cas (Croteau *et al.*, 2000).

Les structures chimiques complexes des alcaloïdes rendent l'élucidation de leur structure et les études sur leur biosynthèse très difficile. Des études établissent clairement que les alcaloïdes sont principalement formés des acides aminés tryptophane, tyrosine, phénylalanine, lysine et arginine. Ils peuvent être isolés ou liés à une autre fraction (de type stéroïde, sécoiridoïde, terpénoïde). Il a été montré qu'une ou deux transformations seulement sont nécessaires pour convertir ces acides aminés en substrat pour le métabolisme des alcaloïdes, fortement spécifique à chaque espèce de plante. Ces transformations nécessaires pour la biosynthèse des alcaloïdes sont catalysées par des enzymes fortement stéréo, régio et substrat-spécifiques (Croteau *et al.*, 2000).

Selon leurs acides aminés précurseurs, les alcaloïdes sont regroupés dans plusieurs catégories telles que : les alcaloïdes terpénoïdes indoliques, tropaniques, pyrrolizidiniques, acridoniques, isoquinoliniques et quinolizidiniques.

Les alcaloïdes sont considérés comme faisant partie du système de défense chimique constitutif de nombreuses plantes. Leur rôle dans la défense chimique est supporté par leur large gamme d'effets physiologiques sur les animaux et par leur activité antibiotique et répulsive contre les insectes. Par exemple, la nicotine, alcaloïde trouvé dans le tabac, a été le premier insecticide utilisé par l'homme. Un autre alcaloïde efficace contre les insectes est la caféine trouvée dans les graines et les feuilles de cacao, café et thé. L'acide jasmonique joue un rôle dans la régulation de la réponse des plantes produisant des alcaloïdes. Deux groupes d'alcaloïdes ont été souvent étudiés du fait de leur rôle de défense : les alcaloïdes pyrrolizidiniques et les alcaloïdes quinolizidiniques.

Les alcaloïdes pyrrolizidiniques, formés à partir de l'acide aminé ornithine et possédant le noyau pyrrolizidine commun (Figure 10.A), sont fréquemment trouvés dans les astéracées et les borraginacées (Aniszewski, 2007). Ces alcaloïdes rendent la plupart de ces plantes toxiques pour les mammifères. Par exemple, la séneçonine N-oxyde est synthétisée dans les

racines des plantes du genre *Senecio*, et elle les rend responsable d'intoxication du bétail et représente un danger pour la santé humaine.

Les alcaloïdes quinolizidiniques apparaissent principalement dans les plantes du genre *Lupinus*. Ils sont issus de la transformation de l'acide aminé lysine et ont en commun le noyau quinolizidine (Figure 10.B) (Aniszewski, 2007). En raison de leur goût amer, les alcaloïdes de type lupinine, peuvent avoir une fonction répulsive contre l'attaque des insectes (Croteau *et al.*, 2000).



Figure 10 : Schéma du noyau commun aux alcaloïdes pyrrolizidiniques : la pyrrolizidine (A.) et du noyau commun aux alcaloïdes quinolizidiniques : la quinolizidine (B.)

Outre leur rôle dans la défense des plantes, les alcaloïdes sont utilisés en médecine. Par exemple, l'un des alcaloïdes prescrits le plus connu est un antitussif et analgésique : la codéine faisant partie du groupe des alcaloïdes isoquinoliniques (issus de la tyrosine) (Figure 11.A). Un autre alcaloïde isoquinolinique est très utilisé en médecine pour ses propriétés analgésiques : la morphine (Figure 11.B) (Croteau *et al.*, 2000; Verpoorte et Memelink, 2002).

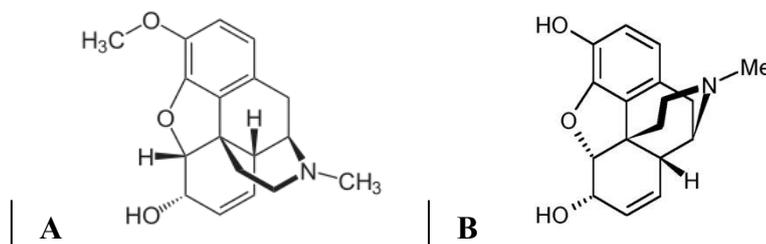


Figure 11 : Schéma de deux alcaloïdes isoquinoliniques : la codéine (A.) et la morphine (B.)

D'autre part, une des voies de biosynthèse les plus étudiées et faisant l'objet d'essai d'ingénierie génétique est celle des alcaloïdes terpénoïdes indoliques, dont environ 15 d'entre eux ont un intérêt industriel tels que les anti-tumeurs : vinblastine et vincristine (Croteau *et al.*, 2000; Verpoorte et Memelink, 2002). La plupart des alcaloïdes sont utilisés comme médicament, mais certains peuvent être utilisés comme substance aromatique ou modèle pour les études pharmacologiques.

3.3.d. Les glucosinolates

Les glucosinolates sont des composés secondaires contenant de l'azote et du soufre, présents exclusivement dans les plantes composant l'ordre des Capparales (Brown *et al.*, 2003). Cet ordre comprend la famille des Brassicacées. Elle regroupe des cultures importantes en agriculture (colza), des légumes du genre *Brassica* (chou, navet), et la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Plus de 130 glucosinolates ont été identifiés (Brown *et al.*, 2003; Radojčić redovniković *et al.*, 2008). Ils partagent une structure contenant un résidu β -D-glucopyranose lié à un ester de sulfate, *via* un atome de soufre. Leur diversité structurale

découle de la variabilité du groupement R qui dérive d'un ou de plusieurs acides aminés (Figure 12) (Brown *et al.*, 2003).

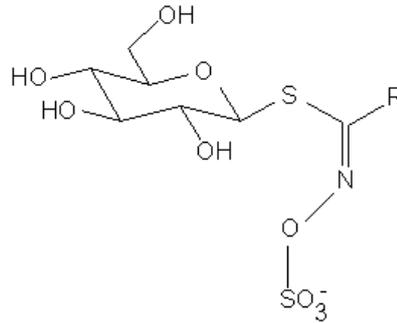


Figure 12: Représentation d'un glucosinolate

Selon la nature des précurseurs (acides aminés) du groupement R, les glucosinolates peuvent être divisés en trois classes : les glucosinolates aliphatiques dérivés de la méthionine, de l'isoleucine, de la leucine et de la valine, les glucosinolates aromatiques dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine et les glucosinolates indoles dérivés du tryptophane (Radojčić redovniković *et al.*, 2008).

Les plantes présentant des glucosinolates sont capables de synthétiser une enzyme de type thioglucosidase : la myrosinase. Lors d'une blessure, ou d'une attaque de pathogène ou d'insecte, la perte de l'intégrité cellulaire active le système glucosinolate-myrosinase. La myrosinase dégrade les glucosinolates en de nombreux produits de dégradation. Les conditions chimiques telles que le pH, la disponibilité en fer et la présence de protéines interagissant avec la myrosinase déterminent la composition finale du mélange de produits de dégradation.

La teneur en glucosinolates représente environ 1% de la masse sèche (MS) des tissus des légumes *Brassica*. Mais cette teneur peut fortement varier et peut même atteindre les 10% de la MS dans les graines de certaines plantes. La plupart des espèces contiennent un nombre limité de glucosinolates (pas plus d'une douzaine). Des facteurs environnementaux tels que la fertilisation, la pression des pathogènes, les blessures peuvent affecter la teneur en glucosinolates dans la plante (Fahey *et al.*, 2001).

Le système glucosinolate/myrosinase et les produits d'hydrolyse constituent un système de défense des plantes contre les insectes ravageurs et certains pathogènes microbiens. De nombreuses études ont observé que les glucosinolates inhibaient la croissance des insectes généralistes et avaient une activité répulsive. Il a aussi été montré que la plante répondait aux attaques des ravageurs par une accumulation de glucosinolates, ce qui permet probablement d'augmenter leur résistance. Généralement, les glucosinolates indoles sont les plus souvent induits. Le rôle des glucosinolates dans la défense contre les pathogènes est moins clair. De nombreuses études démontrent la toxicité *in vitro* des produits d'hydrolyse des glucosinolates sur les bactéries et les champignons. Néanmoins, peu d'études établissent une corrélation entre les teneurs en glucosinolates et la résistance *in vivo* aux pathogènes. Néanmoins, les cultures du genre *Brassica* sont reconnues comme culture de rupture en raison de leurs

teneurs en glucosinolates montrant une activité inhibitrice sur les pathogènes du sol (Radojčić redovniković *et al.*, 2008).

4. Métabolismes primaire et secondaire reliés à la disponibilité en ressources C et N

De nombreux facteurs abiotiques peuvent affecter les métabolismes primaire et secondaire. Un manque de lumière affecte la croissance en diminuant la production de biomasse et la surface foliaire alors qu'une forte lumière active l'expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (PAL, CHS...) conduisant à l'accumulation des produits de réaction. La température agit souvent en interaction avec la lumière. Une diminution de la température associée à une intensité lumineuse suffisante induit une accumulation des anthocyanes dans de nombreux fruits (Macheix *et al.*, 2005). La nutrition minérale est un facteur important affectant les métabolismes primaire et secondaire. Tandis qu'un déficit en bore mène à une accumulation de composés phénoliques (Ruiz *et al.*, 1998) et en flavonoïdes (Carpena *et al.*, 1982), une augmentation de la fertilisation calcique réduit considérablement la concentration foliaire en polyphénols (Ruiz *et al.*, 2003). Carpena *et al.* (1982) observent que les déficiences en phosphore et manganèse n'altèrent pas le niveau de flavonoïdes totaux mais modifient la contribution de chaque groupe de flavonoïdes dans la teneur totale, alors que Peñalosa *et al.* (1989) montrent qu'un niveau de phosphore excessif ou déficient mène à une diminution des teneurs en flavonoïdes dans les feuilles. Les principales molécules issues des métabolismes primaire et secondaire sont formées essentiellement de carbone et d'azote. Les disponibilités en C et N font donc partie des facteurs impactant le plus fortement ces métabolismes.

4.1. L'azote et le carbone : éléments indispensables pour la plante

4.1.a. L'azote, nutriment essentiel et molécule signal

L'azote est un élément indispensable pour la croissance et le développement de la plante. En effet, ce nutriment entre dans la composition de molécules indispensables telles que les acides aminés et les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. Il est aussi un constituant de certains métabolites secondaires (alcaloïdes, phénolamides, glycoalcaloïdes).

En général, l'azote représente 1 à 7% de la matière sèche végétale (Meyer *et al.*, 2004). Les deux formes assimilables par la plante sont la forme nitrique (NO_3^-) et ammoniacale (NH_4^+) appelées formes minérales de l'azote. Quand le sol contient ces deux formes, le nitrate est absorbé préférentiellement. Néanmoins, une grande partie devra être réduite en ammonium dans les racines ou les feuilles pour entrer dans les voies de synthèse des acides aminés et des protéines.

Le nitrate est prélevé par la plante par un transport actif secondaire faisant intervenir des ATPases et des transporteurs (Grignon *et al.*, 1997; Tischner et Kaiser, 2007). La demande en azote est déterminée par la vitesse de croissance de la plante. La vitesse d'absorption est régulée par l'ion nitrate ou par les produits de son assimilation (ion ammonium, acides aminés synthétisés) (Grignon *et al.*, 1997). Une fois absorbé, le nitrate peut être stocké dans la

vacuole des cellules racinaires, exporté dans le xylème jusqu'aux parties aériennes ou réduit dans les racines.

L'assimilation du nitrate est réalisée en deux étapes : la réduction du nitrate (NO_3^-) en nitrite (NO_2^-) dans le cytoplasme et la réduction du nitrite (NO_2^-) en ammonium (NH_4^+) dans les chloroplastes. Ces réactions impliquent des enzymes caractéristiques : respectivement la nitrate réductase (NAR) et la nitrite réductase (NIR) (Figure 13). Ces réactions ont lieu principalement dans les parties aériennes (feuilles) chez les herbacées (Faure *et al.*, 1997).

Quand il est présent dans le milieu, l'ammonium peut être absorbé par la plante. Prélevé directement ou issu de la réduction du nitrate, il est incorporé dans les acides aminés. Deux enzymes rentrent en jeu dans l'assimilation de l'ammonium : la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase (GOGAT) (Figure 13) pour former deux molécules de glutamate. La transamination à partir de ces molécules permet de former les acides aminés tels que l'asparagine, l'alanine... (Meyer *et al.*, 2004).

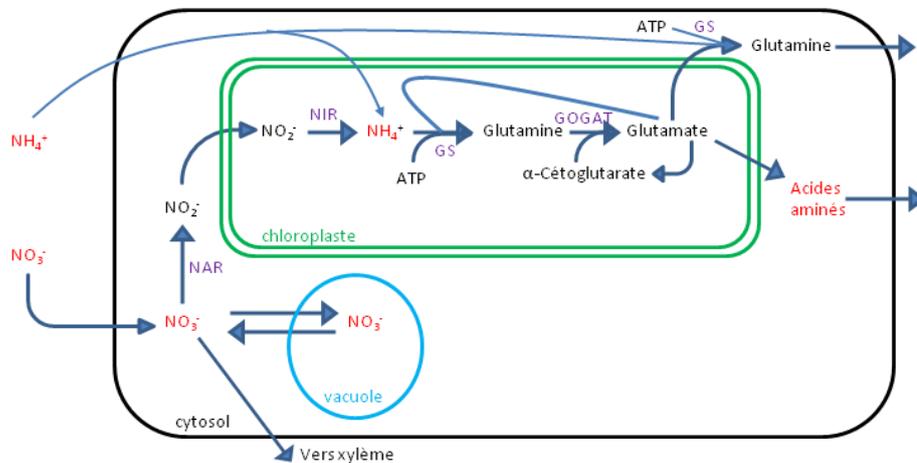


Figure 13: Schéma simplifié de l'assimilation du nitrate et de l'ammonium dans une cellule photosynthétique. NAR : nitrate réductase – NIR : nitrite réductase – GS : glutamine synthétase – GOGAT : glutamate synthase. D'après Meyer *et al.* (2004).

L'azote est un élément essentiel pour la synthèse de molécules indispensables au développement de la plante. Des variations de sa disponibilité dans le milieu affectent donc la croissance végétale. De nombreuses publications montrent qu'une fertilisation azotée pléthorique maximise la production de biomasse des plantes. Grechi *et al.* (2007) ont montré qu'une forte concentration en azote dans le milieu augmentait la biomasse des feuilles de vigne par rapport à des traitements moins concentrés. De même, Adamowicz et Le Bot (2008) ont montré qu'une limitation en azote chez la tomate diminuait la croissance principalement à cause d'une moindre production de surface foliaire. Selon Urbanczyk-Wochniak et Fernie (2005) et Fritz *et al.* (2006a), la limitation en azote chez le tabac diminue la teneur des plants en acides aminés et augmente la teneur en amidon.

Il est communément observé que la disponibilité en azote affecte aussi l'accumulation de certains métabolites secondaires. Une disponibilité en azote limitante pour la croissance de la plante mène à une accumulation de métabolites secondaires carbonés tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes (Hoffland *et al.*, 2000b sur la tomate; Fritz *et al.*, 2006b sur le

tabac; Le Bot *et al.*, 2009 sur la tomate). Sur le tabac, Fritz *et al.* (2006b) ont montré que les concentrations en rutine et en acide chlorogénique étaient respectivement dix fois et quatre fois plus grandes lorsque l'azote dans le milieu était limité. Wilkens *et al.* (1996) ont montré que les concentrations en rutine et en acide chlorogénique étaient fortes en cas de fertilisation azotée limitante (plante non carencée). Hoffland *et al.* (1999) observent chez la tomate que l' α -tomatine, un glycoalcaloïde composé de carbone et d'azote, double sa concentration dans les feuilles lorsque la disponibilité en azote est faible. Ce comportement n'est pas celui décrit pour la nicotine, un alcaloïde, également composé d'atomes d'azote et de carbone. En effet, selon Fritz *et al.* (2006b), les concentrations en ce composé dans les plants de tabac sont trois fois plus faibles en situation de limitation azotée.

Ces profonds changements en réponse à la variation de la disponibilité en azote montrent le rôle important des mécanismes signaux qui régulent ces processus métaboliques. Le nitrate, lui-même, ainsi que les différents métabolites formés pendant son assimilation, peuvent être des molécules signal (Stitt, 1999). Par des régulations transcriptionnelle ou post-traductionnelle, le nitrate peut moduler l'expression de milliers de gènes impliqués dans de nombreux processus. En exemple, il peut impacter son prélèvement et son assimilation en régulant l'expression des gènes codant pour les protéines transporteurs de nitrate, pour les enzymes nitrate et nitrite réductase. Il joue même un rôle de signal dans le métabolisme du carbone en régulant par exemple la production d'acides organiques, ou la production d'équivalents réducteurs par la voie du pentose phosphate ou par la glycolyse (Fritz *et al.*, 2006b; Vidal et Gutiérrez, 2008). Le nitrate est aussi une molécule signal dans les processus du métabolisme secondaire. Fritz *et al.* (2006b), en utilisant des mutants de tabac comme le mutant Nia30 (possédant une quantité faible de l'enzyme nitrate réductase), ont permis de montrer que le nitrate, lui-même, est la molécule signal contribuant à la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes clés du métabolisme des phénylpropanoïdes (PAL, C4H, 4CL...).

Il est connu qu'une absorption importante d'ammonium par la plante peut créer de nombreux effets négatifs complexes décrits sous l'appellation de syndrome ammoniacal (Mehrer et Mohr, 1989). La concentration en ammonium toxique pour la plante dépend de l'espèce et des conditions environnementales. Un déficit en cations et anions dans la plante, une forte baisse de la teneur en acides organiques, l'accumulation d'acides aminés dans les racines et l'accumulation de glucides solubles dans les feuilles sont les principaux effets négatifs compris dans la notion de syndrome ammoniacal (Chaillou et Lamaze, 1997). Cox *et al.* (1973) ont montré, sur plants de blé, que le taux de croissance est beaucoup plus faible lorsque l'azote est apporté par l'ammonium comparé à un apport de la même quantité d'azote par du nitrate (Figure 14). La plante montre même des symptômes de toxicité tels que la présence de spots chlorotiques sur les feuilles et la production de racines courtes et épaisses. Selon Zornoza *et al.* (1991), la biomasse de plants de tomate cultivés avec une fertilisation azotée mixte ($\text{NO}_3/\text{NH}_4^+ = 60/40$) est plus faible que celle de plants de tomate poussant seulement avec du nitrate. Néanmoins, il a été montré que l'addition d'une faible quantité d'ammonium à une fertilisation nitrique (20-30% de l'azote total) permettait d'augmenter le taux de croissance des plants de blé (Cox *et al.*, 1973) (Figure 14).

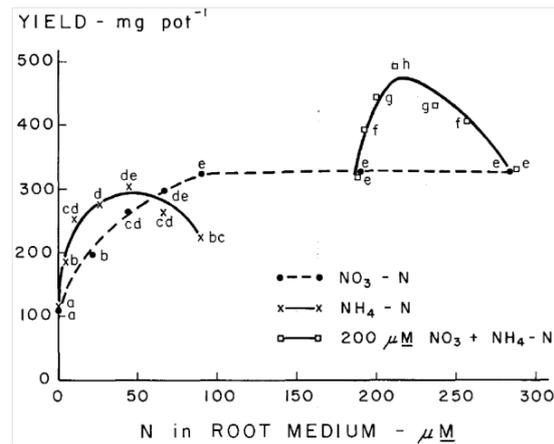


Figure 14: Graphique montrant l'effet de la concentration et de la forme d'azote sur le rendement de plants de blé. D'après Cox *et al.* (1973).

La présence d'azote sous forme ammoniacale dans le milieu modifie aussi les teneurs en composés primaires et secondaires. Errebhi et Wilcox (1990) ont rapporté que les teneurs en glucides solubles et en acides organiques étaient plus faibles lorsque la fertilisation était essentiellement ammoniacale. Selon Toor *et al.* (2006), les teneurs totales en composés phénoliques dans des tomates poussant sur fertilisation à dominante ammoniacale (80% NH_4^+) sont faibles par rapport aux concentrations observées lorsque la fertilisation est à dominante nitrique (80% NO_3^-).

Les études sur la forme d'azote sont essentiellement focalisées sur les effets sur la croissance et la production des plantes. De nombreux articles étudient différents modes de fertilisation en relation avec la croissance et l'absorption ionique. Peu montrent les effets sur les concentrations en différents composés de défense. A notre connaissance, seul Toor *et al.* (2006) montrent les effets de la forme d'azote sur les teneurs en composés phénoliques totaux mais ne détaillent pas les effets pour chaque composé.

4.1.b. Le carbone : composant indispensable des molécules végétales

Le carbone constitue environ 40% de la masse sèche de la plante. Le carbone est un élément indispensable pour la production aussi bien de composés primaires (acides aminés, acides organiques, glucides...) que secondaires (composés phénoliques, glycoalcoïdes...). C'est donc un élément essentiel que la plante va trouver dans l'atmosphère sous forme de dioxyde de carbone (CO_2).

Par la photosynthèse, le CO_2 atmosphérique est fixé par la plante grâce à l'énergie solaire. Dans les chloroplastes, la photosynthèse comprend deux phases : les réactions photochimiques convertissant l'énergie solaire en énergie chimique (ATP, $\text{NADPH} + \text{H}^+$) et le cycle de Calvin-Benson permettant la fixation du carbone (Campbell *et al.*, 2004) (Figure 15).

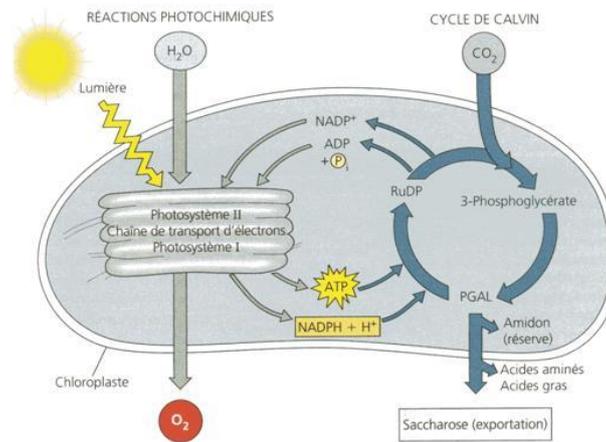


Figure 15: Schéma d'ensemble de la photosynthèse intégrant les deux phases : les réactions photochimiques et le cycle de Calvin (Campbell *et al.*, 2004) – PGAL : phosphoglycéraldéhyde.

Le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère est la seule source de carbone pour la plante. Il est assimilé pour permettre la production de glucides. Des variations de sa disponibilité peuvent donc affecter la croissance végétale.

De nos jours, la concentration en CO₂ atmosphérique ([CO₂]) est plus élevée qu'elle ne l'était il y a plusieurs années et continue à augmenter. De nombreuses études observent l'effet de cette augmentation sur le développement des plantes. Ainsworth *et al.* (2007) ont montré que l'enrichissement en CO₂ de l'atmosphère (550 µmol/mol contre 375 µmol/mol en atmosphère ambiante) augmentait le taux de photosynthèse dans les feuilles et donc menait à une plus forte croissance des plants de soja. De plus, Li *et al.* (2007) ont montré qu'un doublement de la concentration en CO₂ (720 µmol/mol contre 360 µmol/mol en atmosphère ambiante) augmentait l'efficacité d'utilisation de l'eau par la plante. Ils ont montré que la biomasse, la hauteur d'un plant de tomate, l'épaisseur de la tige et le taux photosynthétique augmentaient respectivement de 67%, 22%, 24% et 55% en situation de [CO₂] élevé. La photosynthèse est donc stimulée par l'enrichissement en CO₂, ce qui mène à une accumulation de photosynthétats (hexoses, saccharose, amidon) (Ainsworth *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

Les effets positifs de l'enrichissement en CO₂ sur la croissance sont bien connus. De ce fait, depuis les années 1960, les producteurs de légumes en serre pratiquent un enrichissement en CO₂ de l'atmosphère (Van De Vooren *et al.*, 1986). Un enrichissement en CO₂ dans la serre de 750 à 800 µmol/mol augmente le rendement de 30% comparé à des conditions standard (340 µmol/mol) (Peet et Welles, 2005).

Les variations de disponibilité en carbone modifient aussi les concentrations en certains métabolites secondaires de défense. Lors de l'enrichissement en CO₂, l'augmentation des composés secondaires basés sur le carbone, tels que les phénylpropanoïdes et les tannins, est la tendance générale même si certains travaux ne montrent aucun changement des teneurs en ces composés et même observent une diminution (Peñuelas *et al.*, 1997; Peñuelas et Estiarte, 1998; Hartley *et al.*, 2000). Matros *et al.* (2006) ont montré que l'accumulation foliaire de composés secondaires basés sur le carbone (acide chlorogénique principalement) était accompagnée d'une augmentation du niveau d'activité de l'enzyme phénylalanine ammonia

lyase (PAL), catalysant la première réaction de la voie de biosynthèse des composés phénoliques. Néanmoins, les teneurs en terpènes ou en lignine ne subissent aucun changement en situation de [CO₂] atmosphérique élevée (Matros *et al.*, 2006). Quant à la teneur en nicotine, métabolite secondaire basé sur le carbone et l'azote, elle diminue dans les feuilles de tabac sous [CO₂] élevée (Rufty *et al.*, 1989; Matros *et al.*, 2006).

4.1.c. Relation entre métabolismes du carbone et de l'azote

L'accroissement de la photosynthèse sous enrichissement en CO₂ atmosphérique mène généralement à une augmentation de la croissance de la plante. Néanmoins, l'exploitation maximale de l'enrichissement en CO₂ par la plante ne peut être atteinte que si la plante a les capacités suffisantes pour utiliser cet afflux de carbone. Celles-ci sont souvent limitées par la disponibilité en azote du milieu (Ainsworth *et al.*, 2007). En effet, en situation de limitation azotée, la biomasse n'augmente pas chez certaines espèces telles que le soja, le tabac ou le riz alors que chez le blé, le coton ou le bouleau, la biomasse est plus importante. Cependant, cette augmentation est plus faible que chez les plantes sous fertilisation azotée forte (Stitt et Krapp, 1999). En situation de limitation en azote, les plantes poussant sous [CO₂] élevée voient leur photosynthèse diminuer de 9% alors qu'en situation d'apport en azote pléthorique, elle augmente de 17%.

Les métabolismes du carbone et de l'azote sont intimement liés. De l'azote minéral est nécessaire à la photosynthèse (présence d'azote dans la chlorophylle et dans la ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase) et à l'utilisation des glucides pour la croissance de la plante. A l'inverse, la dégradation des glucides fournit du potentiel réducteur et de l'ATP aux réactions de synthèse des molécules contenant de l'azote telles que les acides aminés (Fritz *et al.*, 2006a). De ce fait, en production, l'enrichissement en CO₂ doit être accompagné d'un suivi précis des concentrations en nutriments dans le milieu, et principalement de la teneur en azote (Matros *et al.*, 2006).

Alors qu'en situation de fertilisation azotée forte, l'enrichissement en CO₂ permet d'augmenter la teneur en acides aminés totaux, il mène à leur diminution sous limitation en azote (Geiger *et al.*, 1999). Les protéines foliaires ne sont pas altérées par l'élévation de la [CO₂] en situation d'apport en azote fort, tandis que leurs teneurs diminuent lorsque la plante est limitée en azote (Geiger *et al.*, 1999).

Selon Matros *et al.* (2006), les différents apports d'azote n'influencent pas les teneurs totales en principaux composés secondaires basés sur le carbone. Néanmoins, plusieurs composés secondaires mineurs, non visibles dans des échantillons de plantes sous fertilisation forte en azote, sont détectables en situation d'apport en azote faible. Ce qui indique que la réponse du métabolisme est plus complexe quand l'apport d'azote est limité pour la croissance.

La plupart des articles publiés sont essentiellement focalisés sur un métabolisme (croissance ou métabolisme secondaire) alors que l'autre reste en second plan. En effet, de nombreuses études concernent l'effet de l'augmentation du CO₂ atmosphérique liée à l'activité humaine. Mais ces articles se focalisent sur l'effet de la disponibilité en ressources carbonées et azotées sur la croissance et les teneurs en principaux métabolites primaires (Ainsworth *et al.*, 2007;

Grechi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008) ou sur les concentrations en métabolites secondaires impliqués dans la défense des plantes (Hoffland *et al.*, 2000a & b; Matros *et al.*, 2006). A notre connaissance, peu d'études (Ruan *et al.*, 2010; Ibrahim *et al.*, 2011) intègrent les deux métabolismes alors qu'ils sont interdépendants. En effet, la plante est perpétuellement face à un dilemme pour l'allocation des ressources.

4.2. Dilemme pour la plante : partage des ressources entre les deux métabolismes

Les plantes sont limitées en ressources pour la réalisation de leur processus physiologiques primaires et secondaires. De plus, ces deux métabolismes partagent les mêmes précurseurs. En exemple, la phénylalanine, précurseur de la voie de biosynthèse des composés phénoliques, est aussi un acide aminé essentiel pour la production des protéines. La synthèse des composés phénoliques est donc en compétition avec les mécanismes de croissance pour les substrats communs. La plante fait continuellement face à un dilemme : la compétitivité de la plante exige une croissance soutenue, tandis que la défense nécessite la synthèse accrue de métabolites secondaires (Herms et Mattson, 1992). Ce compromis permanent est à la base d'hypothèses explicitant le partage des ressources entre les métabolismes, primaire et secondaire, dont les plus citées sont :

- La théorie de défense optimale (ODT) : la première affirmation de cette théorie est que la défense est coûteuse et donc qu'elle devrait être allouée aux parties les plus importantes (avec une forte « valeur ») pour la plante et/ou qui sont plus susceptibles d'être attaquées (Kaplan *et al.*, 2008). L'ODT prédit que les parties de la plante qui sont soit fortement susceptibles d'être attaquées, soit importantes pour la plante devraient avoir un niveau élevé de défense constitutive et une faible inductibilité. Au contraire, les parties qui sont faiblement susceptibles d'être attaquées ou moins importantes pour la plante devraient avoir un niveau de défense constitutive faible mais une forte inductibilité (Barto et Cipollini, 2005). Par exemple, les feuilles jeunes sont considérées comme plus « précieuses » que les feuilles matures pour la plante et donc, le plus souvent, elles possèdent une concentration en métabolites secondaires bien plus importante que les feuilles matures (Kaplan *et al.*, 2008).
- Le modèle de compétition des protéines (PCM) : il se focalise sur un mécanisme particulier. Au contraire des autres théories, il propose que le compromis entre croissance et synthèse de composés phénoliques résulte surtout de la compétition pour un acide aminé aromatique spécifique, la phénylalanine et non de la compétition pour un pool limité de nutriments (Mattson *et al.*, 2005). La réaction dont le substrat est la phénylalanine est un point d'embranchement de la synthèse des protéines et des composés phénoliques (Gayler *et al.*, 2008).
- L'hypothèse d'équilibre entre processus de croissance et de différenciation (GDB): elle est basée sur l'existence d'un compromis entre croissance et différenciation (incluant le métabolisme secondaire) dans le cadre d'une compétition pour la ressource carbonée. Elle suggère que tous les facteurs environnementaux qui réduisent le taux de croissance plus que la photosynthèse augmentent le pool de ressource carbonée disponible pour le métabolisme secondaire (Gayler *et al.*, 2008). Herms et Mattson (1992) ont introduit un diagramme (Figure 16) pour décrire les effets de la disponibilité en nutriment sur le métabolisme secondaire. Ce

diagramme explore trois domaines contrastés. Dans la zone 1, la déficience sévère en ressources altère fortement le système photosynthétique et limite la vitesse d'assimilation du CO₂. Dans cette zone, toute augmentation de la disponibilité des ressources stimule l'assimilation nette du CO₂ plus intensément que la vitesse de croissance, conduisant à un surplus de C dans la plante qui profite au métabolisme secondaire. La priorité est donc orientée sur le métabolisme secondaire qui requiert moins de ressources. Les zones 2 et 3 représentent des conditions de disponibilité en ressources qui sont typiquement retrouvées en agriculture (Le Bot *et al.*, 2009). Dans ces zones, la disponibilité des ressources permet un taux d'assimilation de CO₂ *quasi* maximal. Dans la zone 2, l'augmentation de la disponibilité en ressources stimule fortement la vitesse de croissance qui détourne progressivement le C assimilé en sa faveur. Cela fait apparaître une relation inverse entre la croissance et le métabolisme secondaire. Dans la zone 3, une nouvelle augmentation de la disponibilité en ressources correspond à une levée de toutes les limitations. La vitesse de croissance devient maximale et une situation d'équilibre entre les deux métabolismes se met en place.

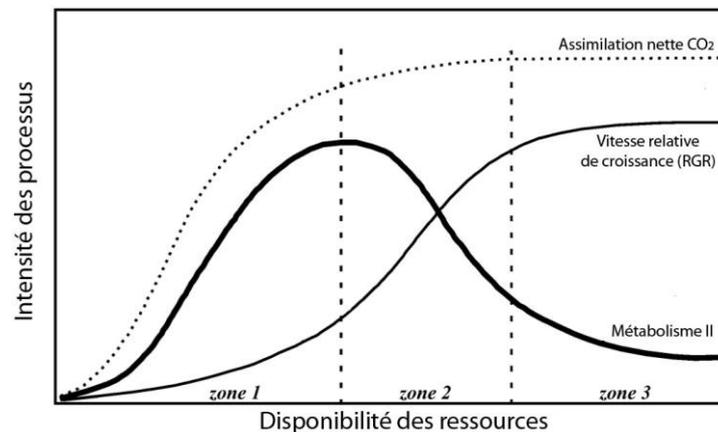


Figure 16: Diagramme représentatif de l'effet de la disponibilité en ressources sur le compromis entre croissance et métabolisme secondaire, selon l'hypothèse GDB. D'après Loomis (1932) et Herms et Mattson (1992) dans Le Bot *et al.* (2009).

- L'hypothèse d'équilibre carbone/nutriment (CNB) : cette hypothèse postule que le statut en carbone et nutriments de la plante, déterminé par la disponibilité en ressources, contrôle directement l'allocation aux composés secondaires (Hamilton *et al.*, 2001). Elle est basée sur le fait qu'une déficience modérée en nutriment limite davantage la croissance que la photosynthèse. Les glucides s'accumulent en excès et peuvent être alloués aux métabolites secondaires riches en carbone (Herms et Mattson, 1992). Néanmoins, la croissance a toujours la priorité sur la production de métabolites secondaires. Ainsi, le carbone et les nutriments sont alloués au métabolisme secondaire seulement après que la demande pour la croissance soit fournie (Hamilton *et al.*, 2001). Cette hypothèse prédit que les plantes poussant sous faible disponibilité en azote vont favoriser l'allocation du carbone et des nutriments aux métabolites de défense composés exclusivement de carbone. Alors que les plantes poussant sous faible disponibilité en carbone vont favoriser l'allocation aux métabolites de défense composés d'azote (Herms et Mattson, 1992).

L'hypothèse CNB est souvent suffisante pour expliquer l'allocation au métabolisme secondaire. En effet, la disponibilité des nutriments est, le plus souvent, le facteur majeur

limitant la croissance. L'hypothèse GDB s'adresse à tous les facteurs environnementaux affectant la croissance (sauf le facteur lumière qui affecte plus fortement la photosynthèse que la croissance; Stamp, 2003). Cela fournit un cadre plus complet du compromis entre croissance et métabolisme secondaire (Herms et Mattson, 1992).

A ce jour, ces différentes hypothèses ont été testées sur de nombreuses plantes. Si certaines études corroborent ces théories, d'autres ne sont pas en accord. Par exemple, une méta-analyse sur les données de la littérature sur les plantes ligneuses soumises à diverses manipulations environnementales (fertilisation, ombrage, enrichissement en CO₂...) réalisée par Koricheva *et al.* (1998) a montré que l'évolution des composés phénoliques était conforme à l'hypothèse GDB alors que ce n'était pas le cas pour les terpènes et les tannins. La difficulté réside dans le fait que les métabolites secondaires forment une grande diversité de composés tant par la structure que par la fonction. Il est donc impossible d'affirmer qu'une de ces théories peut rendre compte de toutes les réponses observées.

Certaines théories, telles que l'hypothèse CNB sont critiquées et des améliorations sont proposées (Hamilton *et al.*, 2001). Stamp (2003; 2004) a même montré, par deux fois, qu'il était difficile de tester rigoureusement ces théories.

A travers l'explicitation de ces théories, nous avons vu que les disponibilités en azote (N) et en carbone (C) faisaient partie des principaux facteurs extrinsèques dans l'allocation des produits issus de la photosynthèse au métabolisme secondaire. A l'échelle de la plante, le ratio C/N des tissus reflète le niveau de disponibilité de ces ressources dans l'environnement. En effet, ce ratio est considéré comme un bon indicateur de cette disponibilité et il a été souvent utilisé pour diagnostiquer le niveau de croissance des organes (Grechi *et al.*, 2007).

Alors que certaines théories, telles que la CNB, incluent le ratio C/N dans leurs affirmations comme positivement corrélé aux métabolites secondaires riches en carbone et négativement à ceux basés sur l'azote, à notre connaissance, peu d'études (Hoffland *et al.*, 1999; Hoffland *et al.*, 2000b; Ibrahim *et al.*, 2011) l'utilisent comme indicateur du compromis entre métabolismes. Pourtant, il est relié à la fois à la croissance et au métabolisme secondaire, ce qui en fait un bon candidat comme indicateur de ce compromis.

5. Influence combinée de la disponibilité en ressources et de l'attaque de bioagresseurs sur le compromis entre métabolismes

En horticulture, la recherche de la productivité et de la qualité des fruits repose en bonne partie sur le contrôle des bioagresseurs : des champignons, bactéries et virus provoquent des maladies, des insectes affaiblissent la plante par succion, forage ou par transmission de maladies, des nématodes se nourrissent de racines et des adventices entrent en compétition avec la plante pour la lumière, les nutriments et l'eau.

Dans notre étude, la plante-hôte choisie est la tomate. Il s'agit d'une plante modèle importante pour la recherche sur les fruits charnus. Nous expliquerons les différents arguments motivant ce choix dans la partie 6. Néanmoins, les différents agresseurs étudiés ici sévissent aussi sur de nombreuses cultures maraichères en champ comme en serre.

5.1. Les principaux bioagresseurs de la tomate

5.1.a. Insectes

Les insectes et les acariens sont les principaux bioagresseurs arthropodes de la tomate. Le type de dégâts dépend du type des pièces buccales que possède le bioagresseur. La plupart des ravageurs ont des pièces buccales de type broyeur (tels que les altises et les mineuses). Leurs mandibules leur permettent d'arracher et de mâcher des parties de feuilles, tiges ou fruits. D'autres sont des piqueurs-suceurs. Les dégâts de ces arthropodes apparaissent souvent en taches ou par des déformations des feuilles, fruits et tiges. Ils percent les tissus végétaux et aspirent la sève (Csizinszky *et al.*, 2005). Ces insectes (tels que les aleurodes ou les pucerons) ne provoquent des dommages que lorsqu'ils agissent en grand nombre. Néanmoins, les virus qu'ils peuvent véhiculer provoquent des maladies bien plus importantes (Naika *et al.*, 2005).

Les espèces de pucerons les plus communes attaquant la tomate sont le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*), le puceron du coton (*Aphis gossypii*) et le puceron de la pomme de terre (*Macrosiphum euphorbiae*). Ils se différencient par leur taille et leur couleur. Les pucerons se nourrissent en se fixant sur la face inférieure des feuilles et en aspirant la sève du phloème. Les symptômes sont des taches, chloroses et déformations des feuilles. L'excédent sucré de la sève est immédiatement excrété par les pucerons et s'accumule sur la surface supérieure des feuilles et fruits. Des champignons, tels les fumagines, finissent par s'y développer, causant des dégâts d'aspects. Néanmoins, les pucerons sont plus dangereux en tant que vecteur de virus (tel que le virus Y de la pomme de terre) (Csizinszky *et al.*, 2005).

Les espèces d'aleurodes ayant comme plante-hôte la tomate sont l'aleurode du tabac (*Bemisia tabaci*), l'aleurode *Bemisia argentifolii* et l'aleurode des serres (*Trialeurodes vaporariorum*). Les adultes ressemblent à de petits papillons blancs mesurant 1 à 1,5 mm de longueur. Ils s'installent et déposent leurs œufs sur la face inférieures des feuilles (Csizinszky *et al.*, 2005). Comme les pucerons, les adultes et les larves causent des dégâts directs sur la plante par succion de la sève. Ils sécrètent eux aussi du miellat où vont pouvoir se développer des moisissures (Berlinger, 1986).

Les altises sont des coléoptères de 3 à 4 mm de long possédant de grandes pattes postérieures adaptées pour le saut. Les altises des genres *Epitrix* et *Phyllotreta* arrivent dans les champs de tomate après l'hiver. Elles ont des pièces buccales de type broyeur qui leur permettent de se nourrir des feuilles. Les symptômes apparaissent sous forme de poinçonnements. Les dégâts sur les plants âgés ne réduisent pas significativement le rendement. Néanmoins, sur plantules, ils peuvent mener à un retard de croissance ou même à la mort de la plante (Csizinszky *et al.*, 2005).

Certains insectes, comme les mineuses, se nourrissent non pas de la totalité de la feuille, mais seulement du parenchyme. L'épiderme est donc laissé intact. Elles créent des galeries à l'intérieur des feuilles, fruits et tiges. Une espèce mineuse native d'Amérique du Sud, *Tuta absoluta*, a été détectée en Europe pour la première fois à la fin de l'année 2006 dans le sud de l'Espagne. Depuis, cet insecte s'est répandu en Europe et dans les pays Nord-Africain du pourtour méditerranéen. Son expansion est fulgurante et il est passé, en seulement quelques

années, d'un insecte sur tomate observé en Amérique du Sud à une menace majeure pour la production mondiale (Desneux *et al.*, 2011). Outre son expansion rapide, il est l'un des bioagresseurs les plus nocifs sur tomate car il peut attaquer la plante à tous ses stades de développement faisant des dégâts autant sur les organes végétatifs (feuilles, tiges, apex) que reproducteurs (fleurs, fruits) (Ecole *et al.*, 2001). Il a été signalé pour la première fois en Corse et dans le Var et les Bouches-du-Rhône à l'automne 2008. On considère actuellement qu'aucun bassin de production n'est exempt de ce parasite.

Même si la plante hôte majeure est la tomate, *T. absoluta* peut également attaquer la pomme de terre, l'aubergine et le poivron ainsi que d'autres Solanacées adventices ou ornementales telles que le *Datura* ou les morelles. *Tuta absoluta* est un lépidoptère de la famille des *Gelechiidae*. Son cycle de vie comprend 4 stades de développement : œuf, larve, pupa et adulte. L'adulte est un micro lépidoptère de 6 à 7 mm de longueur de couleur gris argenté avec des taches brunes sur les ailes (Ramel et Oudard, 2008). Les adultes pondent les œufs sous les feuilles ou sur les tiges et, dans une moindre mesure sur les fruits (Desneux *et al.*, 2010). Après éclosion, la larve passe par quatre stades avant la pupation. La larve L1 est de couleur crème et devient verdâtre puis rose au fur et à mesure de son développement (Ramel et Oudard, 2008) (Figure 17.A.). Cet insecte étant une mineuse, les jeunes larves pénètrent dans les feuilles, les fruits ou les tiges où elles peuvent se nourrir et se développer. La pupa, de 5 à 6 mm de longueur, est verdâtre et devient plus noire lorsque l'émergence de l'adulte est proche (Desneux *et al.*, 2010). *Tuta absoluta* réalise son cycle de vie en moins d'un mois et a plutôt une activité nocturne.

Les dégâts d'une attaque de *Tuta absoluta* sur les feuilles est la présence de mines dans le mésophylle (Figure 17.B.), ce qui affecte la capacité photosynthétique de la plante et diminue le rendement en fruits du plant.

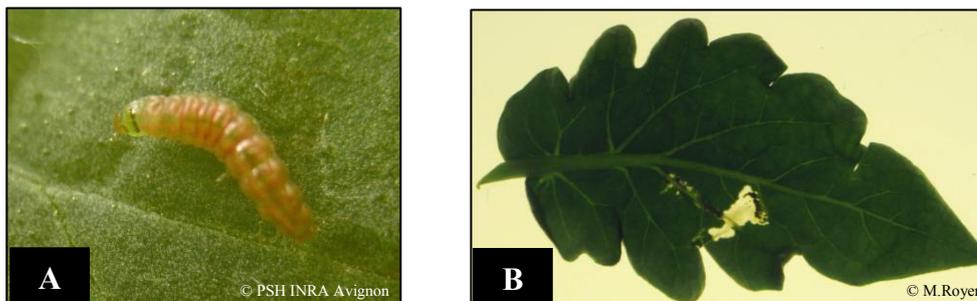


Figure 17: A. Larve de *Tuta absoluta* 1 semaine après éclosion. B. Galeries creusées par une larve de *Tuta absoluta* sur feuille de tomate.

Des galeries peuvent être observées dans les tiges, pouvant causer des nécroses et affecter le développement général des plantes. Les fruits peuvent être eux-aussi creusés de galeries. Enfin, l'insecte peut causer l'arrêt général du développement de la plante en se nourrissant directement de l'apex (Desneux *et al.*, 2010).

La première méthode de lutte mise en place en Amérique du Sud a été le contrôle chimique. Les organophosphates utilisés pour la gestion de *T. absoluta*, ont été remplacés par des pyréthroïdes dans les années 70. Pendant les années 80, une alternance d'insecticides (pyréthroïdes, thiocyclame, Cartap) a montré une efficacité importante. Néanmoins,

l'utilisation d'un nombre limité d'insecticides n'apparaît pas comme une gestion durable de *T. absoluta* en Amérique du Sud. De plus, depuis les années 80, l'efficacité des insecticides a graduellement diminué et des phénomènes de résistance ont été rapportés. D'autres méthodes de lutte ont été étudiées notamment l'utilisation de contrôle biologique (prédateurs, parasitoïdes). Par exemple, le parasitoïde des œufs *Trichogramma achaeae* (hyménoptère) développe une préférence de parasitisme pour *Tuta absoluta*. Dans le sud de l'Espagne, des expérimentations en serre ont montré que *T. achaeae* est fortement efficace pour réduire le niveau d'infestation de *T. absoluta* (Desneux *et al.*, 2010). Le potentiel de prédation de deux insectes, *Macrolophus pygmaeus* et *Nesidiocoris tenuis*, a été testé en conditions de laboratoire. Ces deux prédateurs attaquent les œufs et les premiers stades larvaires de *Tuta absoluta*. Mollà *et al.* (2009) ont montré que *M. pygmaeus* et *N. tenuis* sont capables de réduire l'infestation des feuilles de 75% et 97% respectivement, lorsqu'ils sont bien implantés dans la culture.

5.1.b. Champignons

Les champignons pathogènes de la tomate sont des microorganismes caractérisés par un mycélium formé de filaments nommés hyphes. Ce sont des organismes hétérotrophes qui puisent leur nourriture dans leur plante-hôte (Corbaz, 1990). La pénétration dans les tissus végétaux peut se faire de différentes manières : directement à travers la cuticule et la paroi des cellules, par les ouvertures naturelles tels que les stomates, par les blessures (dues par exemple aux plaies de taille) ou les tissus sénescents (vieilles feuilles, fleurs fanées...). La phase de contamination est causée par la germination de spores présentes sur la plante et la formation d'un appressorium permettant de la pénétrer. Puis s'en suit la phase d'infection où les champignons commencent à prélever leur nourriture chez leur hôte. Certains champignons, parasites obligatoires, sont dépendants des cellules-hôtes vivantes et effectuent leur ponction de façon la moins traumatisante possible. D'autres champignons n'ont pas besoin de cellule vivante pour survivre car ils ont des capacités saprophytiques. Ils vont donc détruire les cellules végétales rapidement après l'infection (Blancard, 2009).

Les champignons présents dans les pays Européens peuvent être regroupés en 3 catégories en fonction de l'organe qu'ils affectent préférentiellement : organe foliaire, vasculaire ou racinaire.

Parmi les champignons attaquant les organes foliaires, l'alternariose dû à *Alternaria tomatophila* est la maladie la plus fréquente sur les cultures de tomate en plein champ. Les oïdioms externe (*Oidium neolycopersici*) et interne (*Leveillula taurica*) peuvent affecter gravement les cultures de tomate si la maladie n'est pas détectée assez tôt. *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la tomate, est plutôt inféodé aux cultures en plein champ. Cette liste de maladie n'est pas exhaustive. D'autres champignons peuvent affecter la culture de tomate en France (tels que *Mycovellosiella fulva*, agent de la cladosporiose ou *Didymella lycopersici*, agent du chancre à *Didymella*) (Blancard, 2009).

Botrytis cinerea, agent responsable de la pourriture grise, est un pathogène nécrotrophe présent dans pratiquement toutes les zones de production de tomate (Watterson, 1986; Blancard, 2009). Il a plusieurs plantes-hôte dont la tomate mais aussi la pomme de terre, la

vigne, ou la fraise (El Oirdi *et al.*, 2011). Il cause des dégâts aussi bien en champ que sous abris. Néanmoins, il est plus redouté en culture en serre car l'environnement y est plus humide et la plante possède de nombreuses blessures d'effeuillage et d'ébourgeonnage. Ce champignon, en effet, affectionne les conditions humides (hr = 95%). La contamination est le plus souvent aérienne. Les conidies germent sur les feuilles et font pénétrer le tube germinatif dans les tissus. Le mycélium se développe en détruisant les parois des cellules et leur contenu (Blancard, 2009). La pénétration peut se faire soit à travers la cuticule, soit par le biais de blessures (Blancard, 2009; El Oirdi *et al.*, 2011; Watterson, 1986). Tous les organes aériens peuvent être affectés, à tous les stades du développement. Les symptômes sur les feuilles sont des taches circulaires et humides de couleur brune. Dessus, des cercles concentriques apparaissent (Figure 18.A). Ces taches peuvent se développer et envahir la totalité de la feuille qui se nécrose totalement. Sur la tige, les symptômes se présentent sous la forme de chancre elliptique, premièrement humide puis devenant sec, de couleur beige à brune (Figure 18.B). En se développant, ils peuvent affecter la tige sur plusieurs centimètres de long (Blancard, 2009; Watterson, 1986). *Botrytis* affecte davantage les fruits verts qui présentent de petits points nécrotiques entourés d'un cercle blanc (Watterson, 1986; Blancard, 2009).

Sur tous les organes infectés, les taches sont recouvertes d'une moisissure à l'aspect flou et de couleur gris brun d'où le nom de pourriture grise (Csizinszky *et al.*, 2005). Ce sont les conidiophores et conidies du champignon qui peuvent être facilement disséminés par le vent, par les humains ou par l'eau (Blancard, 2009).

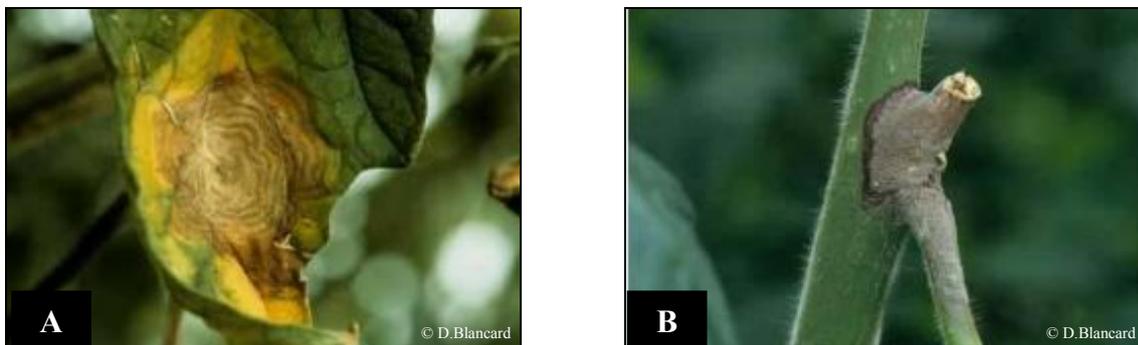


Figure 18: A. Taches circulaires brunes avec cercles concentriques sur feuilles de tomate. B. Chancre sur pétiole commençant à affecter la tige

Le contrôle de *Botrytis* sur des cultures en serre de production est difficile du fait d'un climat favorable au développement de ce champignon, de plantes possédant de nombreuses blessures de taille, et d'une aptitude de *Botrytis* à devenir résistant au faible nombre de fongicides utilisables sur la tomate. En effet, il a été signalé des phénomènes de résistance pour de nombreuses familles de fongicides (ex : souches résistantes aux dicarboximides). Il est donc conseillé d'alterner les familles de fongicides pour éviter l'apparition de résistance.

Botrytis cinerea se développe lors de conditions environnementales bien précises. Une des méthodes de lutte est de supprimer un maximum de conditions nécessaires à son développement. Plusieurs mesures prophylactiques sont conseillées telles que l'aération des serres pour diminuer l'hygrométrie ambiante, ou la taille soignée pour éviter la création de chicots, cibles privilégiées de *Botrytis*. Une lutte biologique contre ce champignon est aussi

possible, car plusieurs bactéries et champignons antagonistes ont été testés. Par exemple, le champignon *Microdochium dimerium* permet de limiter le développement de *Botrytis* sur les plaies de tailles de tomate (Blancard, 2009).

5.1.c. Bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires sans noyau typique. Elles possèdent seulement un chromosome circulaire (Corbaz, 1990; Blancard, 2009). Les bactéries présentent des formes variables : sphérique, ellipsoïdale, filamenteuse... La majorité de celles attaquant les plantes sont sous forme de bâtonnets (Corbaz, 1990; Blancard, 2009).

L'infection par une bactérie ne peut se faire que *via* des zones affaiblies de la plante telles que des ouvertures naturelles (stomates, lenticelles) ou des blessures de taille (Naika *et al.*, 2005; Blancard, 2009). Après leur entrée dans les tissus, les bactéries se développent d'abord dans les espaces intercellulaires puis tuent rapidement les cellules. Les tissus colonisés renferment une quantité importante de bactéries qui pourront être disséminées principalement par l'eau (gouttes d'eau dues à la pluie ou à une eau ruisselante...) (Blancard, 2009). En effet, la plupart des maladies bactériennes se développent dans des conditions d'hygrométrie élevée (Naika *et al.*, 2005). L'eau présente sur les plantes ou stagnante sur le sol permet le développement et la dissémination des bactéries (Blancard, 2009). Tous les organes de la plante peuvent être affectés : feuilles, fruits, racines, moelle de la tige, système vasculaire. Les symptômes associés aux maladies bactériennes peuvent être de trois sortes : des taches huileuses sur les feuilles et les tiges, des infections vasculaires (envahissement des vaisseaux entraînant le flétrissement de la plante), et des tumeurs qui affectent surtout les racines (Corbaz, 1990; Blancard, 2009). Les bactéries qui affectent la tomate sont regroupées dans 6 genres bactériens : *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* (anciennement *Erwinia*), et *Agrobacterium*.

Parmi ces bactéries, l'agent du flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*) affecte la plante par les racines. Les symptômes sont un flétrissement des feuilles terminales qui peut mener à une nécrose de ces feuilles (Naika *et al.*, 2005; Blancard, 2009). Le chancre bactérien dû à *Clavibacter michiganensis* est une des maladies les plus redoutées en culture sous serre. Il est difficile de l'éradiquer sans la prise de mesures drastiques, lorsqu'elle est installée dans une culture (Blancard, 2009).

Pseudomonas syringae pv. *tomato* est l'agent de la moucheture bactérienne. Cette bactérie est présente dans toutes les zones de production de tomate. Elle affecte principalement les cultures en plein champ et sous abri non chauffé (Watterson, 1986; Blancard, 2009). Cette bactérie pénètre dans la plante par l'intermédiaire d'ouvertures naturelles ou *via* des blessures. La bactérie envahit les tissus et s'y multiplie. En 24 heures, plusieurs millions de cellules bactériennes sont produites. Après moins d'une semaine en conditions favorables, les premiers symptômes apparaissent (Blancard, 2009). Sur folioles, apparaissent au hasard des taches grasseuses, marrons à noires entourées d'un halo jaune (Figure 19.A) (Watterson, 1986; Csizinszky *et al.*, 2005; Blancard, 2009). En présence d'humidité, elles s'étendent à de larges parties du limbe. Les folioles se nécrosent. Des taches similaires peuvent apparaître sur les tiges, pétioles et pédoncules (Blancard, 2009). Sur fruits verts essentiellement, de

minuscules taches noires se développent. Elles sont légèrement en relief et parfois entourées d'un halo vert sombre (Figure 19.B) (Csizinszky *et al.*, 2005; Blancard, 2009). Les fruits apparaissent mouchetés d'où le nom de moucheture bactérienne (Watterson, 1986). Comme toutes les bactéries phytopathogènes, *P. syringae* pv. *tomato* se développe sous humidité importante (présence d'eau sur les plantes et stagnante sur le sol). De plus, une température basse (de 18 à 24°C) est propice à son développement.



Figure 19: A. Taches graisseuses, noires entourées d'un halo jaune sur feuilles de tomate. B. Minuscules taches noires en relief sur fruits verts de tomate.

Cette maladie est très difficile à contrôler. Des sels de cuivre peuvent être utilisés pour limiter la propagation de la bactérie. Ils peuvent être utilisés en mélange avec des fongicides tels que les dithiocarbamates. D'autres produits peuvent être employés tels que l'hypochlorite de sodium. Néanmoins, des souches résistantes aux sels de cuivre ont été observées à partir des années 80. Outre l'utilisation de produits chimiques, des mesures sont préconisées (réduire les irrigations par aspersion, réduire la durée d'humectation des feuilles par ventilation) pour diminuer l'hygrométrie et la présence d'eau stagnante dans la culture (Blancard, 2009). L'utilisation de micro-organismes antagonistes de cette bactérie (exclusivement des bactéries : *Pseudomonas putida*, *Rahnella aquatilis*) est expérimentée. L'utilisation d'un stimulateur de défense naturelle (SDN) : l'acilbenzolar-S-méthyl a permis de réduire l'infection par cette bactérie. De plus, une source de résistance a été observée chez des espèces sauvages de tomate contenant le gène « Pto ». Ce gène a pu être inclus dans des variétés destinées aux cultures en plein champ. Néanmoins, une souche de cette bactérie capable de se développer sur des cultivars résistants a été observée en 1995, en Italie. Elle est nommée race 1 de *P. syringae* pv. *tomato* (Blancard, 2009).

La maladie de la moelle noire est causée par *Pseudomonas corrugata*. Elle est présente dans de nombreuses zones de productions sur tous les continents. Elle affecte les cultures de tomate en plein champ et en serre. En France, cette bactérie est surtout présente en cultures sous serre où elle peut se multiplier dans la rhizosphère. Elle pénètre la plante au niveau des racines, du collet ou de la tige *via* des blessures. Elle envahit la moelle, les vaisseaux et peut même coloniser l'épiderme. Les symptômes sont observés exclusivement sur tiges. Des plages brunes à noires, humides apparaissent le long de la tige et peuvent s'étendre sur plusieurs dizaines de centimètres. Des racines adventives aériennes se développent au niveau des parties de tige infectées. Sur une coupe longitudinale de tige infestée, on observe que la moelle devient brune et nécrotique jusqu'à se décomposer (Figure 20.A.). Dans ce cas, le

centre de la tige est évidé en coupe transversale (Figure 20.B.). Lorsque ces symptômes apparaissent, il est généralement trop tard pour intervenir. Néanmoins, des méthodes prophylactiques sont préconisées comme la diminution de la fertilisation, en particulier azotée, pour limiter la vigueur des plantes, l'aération et le chauffage des serres pour limiter les forts taux d'hygrométrie. Actuellement, aucune variété de tomate commercialisée n'est résistante à *P. corrugata* (Blancard, 2009).

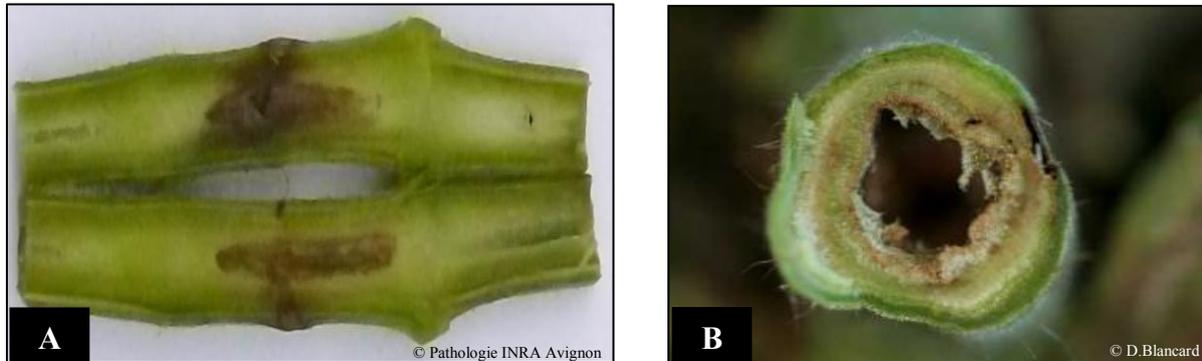


Figure 20: A. Coupe transversale d'une tige de tomate infectée par *P. corrugata*. B. Coupe longitudinale d'une tige de tomate infectée par *P. corrugata*. La moelle est nécrosée.

5.2. La relation entre disponibilité en azote, comportement du bioagresseur et réponse de la plante dépend du type de bioagresseur et du statut azoté de la plante

La fertilisation azotée peut affecter l'intensité de l'attaque des insectes ravageurs mais les rapports de la littérature font souvent état d'une grande disparité de comportements. En effet, Marschner (1995) a rapporté qu'un excès d'azote dans les feuilles mène à une forte accumulation d'acides aminés et à un fort degré d'attaque par les insectes ravageurs. Leite *et al.* (1997) ont aussi montré qu'une augmentation de la teneur en azote des feuilles de tomates cultivées en serre, réduisait la mortalité des larves, augmentait le poids des pupes et l'éclosion d'œufs de *Tuta absoluta*. Néanmoins, dans une autre étude, Leite *et al.* (2004) ont montré aucun effet de la concentration en azote des feuilles de tomate sur les attaques de *Tuta absoluta*, et selon Letourneau *et al.* (1996), les dégâts des mineuses sur les feuilles de tomate ne s'aggravent pas avec l'augmentation de la concentration en azote dans la plante. Ces résultats sont clairement contradictoires et semblent dépendre de la variété utilisée et des conditions environnementales. A notre connaissance, dans ces études, la concentration en azote dans le milieu nutritif n'a pas été contrôlée, ni régulée précisément. Seules les relations entre la concentration en azote foliaire et les dégâts causés par l'insecte ont été explorées. Selon Leite *et al.* (2011), la fertilisation peut être un facteur influençant la population de ravageurs dans une culture. Il serait donc intéressant de connaître l'effet d'une fertilisation azotée limitée sur la population de *Tuta absoluta*.

A notre connaissance, aucune étude a montré les réponses chimiques (des métabolismes, primaire et secondaire) de la tomate à l'agression par *Tuta absoluta*. De plus, les études réalisées sur les composés de défense potentiels de la tomate se sont focalisées uniquement sur les composés organiques volatils et les sucres acylés (de Resende *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008; de Oliveira *et al.*, 2012) et non sur les composés de défense tels que les polyphénols

et les glycoalcaloïdes. Les composés secondaires exsudés par les trichomes glandulaires présents sur les feuilles de tomate joueraient un rôle dans la défense des plante contre les insectes ravageurs tels que *Tuta absoluta* (Ecole *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2004). Ces composés tels que le 2-tridécane et le zingibérène ne sont observés que dans des variétés de tomate sauvage : *L. hirsutum*, *L. pennellii* (de Resende *et al.*, 2006; Maluf *et al.*, 2010). Les études sur des variétés de tomate excréant des quantités importantes de ces molécules montrent une réduction significative des taux de ponte des mineuses, des dégâts sur les plantes, des blessures sur les folioles et du pourcentage de foliole attaquées en comparaison à des variétés témoins (de Oliveira *et al.*, 2012). Ces connaissances sont utilisées pour le développement de cultivars résistants issus de croisement entre variétés sauvages et variétés commerciales (Pereira *et al.*, 2008; De Resende *et al.*, 2006). Selon Hoffland *et al.* (2000a), les composés de défense présents dans les tissus de la tomate (acide chlorogénique, rutine...) sont reliés eux-aussi à la résistance contre les ravageurs. Ces composés réduisent la croissance et ralentissent le développement de nombreux ravageurs. De plus, Rasmy (1985) a démontré que des feuilles de tomates sauvages dont les trichomes ont été enlevés sont toujours plus résistantes envers les tétranyques que les feuilles de tomates cultivées. Cela suggère que les composés de défense tels l'acide chlorogénique et la rutine pourraient jouer aussi un rôle dans la défense de la plante envers *Tuta absoluta*.

La disponibilité en azote peut influencer la résistance des plantes aux pathogènes (bactéries ou champignons). Cette influence peut être favorable ou défavorable aux processus d'infection, dépendant du pathogène étudié (Hoffland *et al.*, 2000b; Lecompte *et al.*, 2010). En effet, Hoffland *et al.* (1999) ont montré que *Botrytis cinerea* était défavorisé sur des plants de tomate à forte fertilisation azotée tandis que les tomates poussant sur une concentration en azote élevée étaient moins résistantes à l'infection par *P. syringae* pv. *tomato*. Ils montrent des corrélations négatives ou positives entre la concentration en N des tissus de la plante et la susceptibilité des plantes aux différents pathogènes. Certains pathogènes ne sont pas influencés par le statut azoté des plantes ; en effet, Hoffland *et al.* (2000b) ont montré qu'il n'existait pas d'effet de la concentration en azote des tissus sur la susceptibilité des plants de tomate à *Fusarium oxysporum*.

Les résultats des études sur le comportement de *Botrytis cinerea* dans le cas de différentes concentrations azotées sont contrastés. En effet, il a été montré que *Botrytis cinerea* était défavorisé sous fort azote sur la vigne (R'Houma *et al.*, 1998), le basilic (Yermiyahu *et al.*, 2006) et le bégonia (Pitchay, 2007). En revanche, une forte nutrition azotée semble diminuer le niveau de maladie sur des plantes de tomate (Hoffland *et al.*, 1999). Lecompte *et al.* (2010) ont montré que la sévérité globale de la maladie était plus faible à fort apport en nitrate sur les 6 isolats de *Botrytis cinerea* étudiés. De plus, Abro *et al.* (2012) ont montré que la pathogénicité de l'inoculum secondaire était plus forte lorsque cet inoculum était issu de spores produites sur des plants poussant sous une très faible ou une très forte disponibilité en azote. La sévérité de la maladie est la plus faible lorsque les spores sont produites sous fertilisation azotée modérée (Abro *et al.*, 2012).

D'anciennes études montrent que le développement de *P. corrugata* est favorisé par une forte fertilisation azotée rendant les tissus végétaux plus tendres (Jones *et al.*, 1982; Catara, 2007).

Alors que l' α -tomatine est le seul composé préformé de défense qui semble jouer un rôle dans les processus de défense de la tomate à *Botrytis cinerea* (Hoffland *et al.*, 1999), López-Gresa *et al.* (2011) ont montré que lors d'une infection par la bactérie *Pseudomonas syringae*, les composés carbonés de défense tels que l'acide chlorogénique et rutine sont induits dans les feuilles de tomate infectées dès 4 heures après inoculation. Cette élévation des concentrations suggère que ces deux composés jouent un rôle protecteur contre l'infection des pathogènes. De plus, Zacarés *et al.* (2007) ont découvert deux nouveaux métabolites induits lors de l'infection (24h après infection) par *P. syringae* : le *p*-coumaroyldopamine et le feruloyldopamine de la famille des amides des acides hydroxycinnamiques (HCAA) ou phénolamides (voir 3.1.a.i.). Ces composés sont antimicrobiens et antioxydants et semblent jouer un rôle dans la défense de la tomate à l'attaque de *P. syringae*. Il semble donc que l'induction des concentrations en composés de défense soit, elle-aussi, pathogène-dépendante.

L'infection par un pathogène altère aussi le métabolisme primaire de la plante. L'infection mène souvent à la formation de zones chlorotiques ou nécrotiques et donc à une diminution de la production d'assimilats photosynthétiques. De plus, le pathogène tente de dévier le métabolisme des glucides à son profit ; il devient donc un puits de carbone en compétition avec les organes végétaux. Enfin, la plante doit réorganiser la disponibilité en nutriments pour faire face à l'attaque des pathogènes (Berger *et al.*, 2004; 2007). Dans les feuilles de tomate infectées par *Botrytis cinerea*, Berger *et al.* (2004) ont montré que la teneur en glucides totaux était plus faible alors que chez *Arabidopsis thaliana* infectée par *P. syringae*, Bonfig *et al.* (2006) ont observé que les teneurs en glucides n'étaient pas affectées. Par ailleurs, l'infection de plants de tomate par *P. syringae* diminue les teneurs en glucose et saccharose (Berber *et al.*, 2010). Les effets de l'infection sur les teneurs en glucides varient donc considérablement en fonction du pathosystème considéré (Berger *et al.*, 2007; Berber *et al.*, 2010). Concernant l'amidon, l'effet de l'infection par *Botrytis cinerea* est mineur. La teneur en amidon diminue faiblement après l'infection et cette diminution est significative seulement 3 jours après l'infection (Berger *et al.*, 2004). Les études sur la bactérie *P. corrugata* sont rares. Très peu d'informations sont disponibles sur les réponses de la plante à son infection, que ce soit au niveau du métabolisme primaire ou secondaire. Gustine *et al.* (1990) ont montré que l'inoculation de *P. corrugata* sur des cals de *Trifolium repens* L. induit une accumulation d'une phytoalexine : la médicarpine durant les premières 24h.

A l'instar des études sur l'effet des apports en azote et carbone sur les métabolismes de la plante, celles portant sur l'effet de l'attaque de bioagresseurs se focalisent aussi sur un seul métabolisme. En effet, ces études portent soit sur l'effet de l'infection sur la croissance, la photosynthèse et la production de métabolites primaires (tels que les acides aminés et les glucides) (Berber *et al.*, 2010; Berger *et al.*, 2004), soit sur la défense de la plante (réponse chimique) en mesurant les concentrations en COV, polyphénols, glycoalcaloïdes... (Stout *et al.*, 1998; López-Gresa *et al.*, 2011). De plus, il est très peu question de l'étude des réponses de la plante (au niveau des métabolismes, primaire et secondaire) à l'infection dans différents cas de fertilisation azotée. Dans leurs études, Hoffland *et al.* (1999; 2000b) croisent la susceptibilité des plantes et leurs statuts azotés dans le cas d'infection par plusieurs pathogènes. Mais ils n'observent pas les différences potentielles dans la réponse de la plante

en termes de métabolites (I^{re} et II^{re}) à l'attaque de pathogène dans le cas de statuts azotés différents.

6. Le modèle tomate

La tomate (*Solanum lycopersicum*) est originaire de la région Andine, en Amérique du Sud, regroupant une partie du Chili, de la Colombie, de l'Equateur, de la Bolivie et du Pérou. Bien que les formes ancestrales de la tomate aient été observées au Pérou et en Equateur, elle fut domestiquée au Mexique. Les Espagnols l'introduisirent en Europe au début du 16^{ième} siècle. Elle fut cultivée et consommée seulement en Europe du Sud jusqu'à la fin du 18^{ième} siècle où elle a commencé à se répandre en Europe du Nord. En cause, la ressemblance de ces fruits avec ceux d'une plante toxique, la belladone. De ce fait, l'acceptation en Europe et son inclusion dans le régime alimentaire furent long. De nos jours, la tomate est un des « légumes » le plus produit et consommé dans le monde, soit dans le marché en frais ou celui des produits transformés (Costa et Heuvelink, 2005; Naika *et al.*, 2005).

La tomate est une plante pérenne mais en agriculture, elle est conduite comme une annuelle qui peut atteindre une hauteur de plus de deux mètres. La forme et la couleur du fruit (du jaune au rouge) varient selon la variété. On peut distinguer deux types de plants de tomate selon que la croissance est indéterminée ou déterminée. Les plants de tomate de plein champ, pour le marché des produits transformés ont, généralement, une croissance déterminée (Costa et Heuvelink, 2005). Elle se caractérise par une période restreinte de floraison et un aspect buissonnant. En effet, les variétés déterminées possèdent des apex qui arrêtent leur croissance après la floraison (Kambale Valimunzigha, 2006). Les variétés cultivées pour le marché du frais (souvent en serres) ont généralement une croissance indéterminée (Costa et Heuvelink, 2005). Chez ce type de plants, l'apex caulinaire maintient sa croissance végétative avec un développement qui alterne la production de 3 ou 4 feuilles suivies d'un bouquet floral durant la quasi-totalité de la période de culture. Lorsqu'elles sont conduites sur un seul axe (*i.e.* pincement des axillaires ou gourmands successifs), ces variétés forment des lianes qui peuvent atteindre dix mètres de hauteur (Kambale Valimunzigha, 2006).

La tomate est le légume-fruit dont la culture et la consommation sont universelles. Elle génère une littérature abondante en raison de son importance économique et parce qu'elle est une plante modèle de choix au niveau mondial pour la recherche sur les fruits charnus. En effet, elle est communément utilisée pour des études physiologiques, cellulaires, biochimiques, moléculaires ou génétiques (Costa et Heuvelink, 2005) sans doute en raison de ses facilités de culture et de manipulation, ainsi qu'un cycle de vie court. Au plan international, une grande diversité génétique est disponible sur cette plante (nombreuses accessions, banques de mutants, plantes transformées). De plus, depuis cette année, le génome complet de la tomate a été séquencé (Sato *et al.*, 2012). A l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), cette plante constitue la plante modèle pour les fruits charnus et un dispositif de recherche conséquent est déployé sur cette espèce.

7. Objectifs de ma thèse

Mon travail de thèse a été effectué dans l'équipe « Métabolites secondaires » de l'unité mixte de recherche Université de Lorraine/INRA « Agronomie-Environnement ». Jusqu'en 2005, cette équipe était tournée vers la découverte et la caractérisation des gènes et enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse des furocoumarines. En 2005, la volonté de l'équipe de développer un axe de recherche plus agronomique rentrant dans les objectifs de l'INRA a permis de démarrer un programme de recherche sur des plantes à usage alimentaire en se concentrant sur la qualité des produits végétaux. Une thèse (C. Bénard : 2005-2009) a été financée pour expliciter l'effet de la limitation en azote sur l'élaboration de la teneur en polyphénols chez le fruit de tomate.

Mes travaux ont pris la suite de cette thèse. L'équipe a décidé de déplacer l'enjeu agronomique principal vers la protection des plantes par stimulation des défenses naturelles sous l'effet de modifications environnementales. En effet, nos compétences ne couvrant pas le domaine médical, l'amélioration de la santé humaine par l'augmentation des teneurs en phytonutriments antioxydants et anti-radicalaires dans les fruits par la modification des conditions de culture est devenu un enjeu secondaire pour l'équipe. Dans un contexte de prise de conscience sur les effets néfastes des produits phytosanitaires pour la santé humaine et l'environnement, proposer des systèmes de culture innovants devient un enjeu important.

Mon premier objectif a été d'étudier les effets de la modification des disponibilités en carbone et azote sur les teneurs en C, N et en différents métabolites primaires (glucides, amidon) et secondaires (principaux polyphénols, tomatine, lignine) dans les différents tissus du jeune plant de tomate. Le ratio C/N des tissus est souvent utilisé pour illustrer le statut de croissance de la plante mais n'a jamais été relié à l'équilibre entre métabolismes. Nous avons voulu tester son pouvoir d'indicateur dans l'établissement du compromis entre les métabolismes, primaire et secondaire. Pour cela, ce ratio a été corrélé avec les teneurs en métabolites primaires et secondaires étudiés ainsi qu'avec la croissance (production de biomasse) dans différentes conditions de disponibilité en carbone et azote.

Les études traitant de la réponse de la plante à l'attaque d'un bioagresseur ne se focalisent que sur un des métabolismes (primaire ou secondaire) et délaissent le deuxième. De plus, très peu d'études ont couplé les effets du bioagresseur et des conditions de fertilisation azotée sur la réponse de la plante. Mon deuxième objectif a été d'observer l'évolution temporelle et spatiale de la réponse d'un plant de tomate attaqué par un bioagresseur, en termes de teneurs en métabolites primaires et secondaires, sous différentes conditions de disponibilité en azote. La réponse du bioagresseur à la teneur en azote disponible pour son hôte a aussi été étudiée. Plusieurs pathosystèmes ont été mis en place (bactérie, champignon, insecte ; nécrotrophe/biotrophe) pour appréhender une possible réponse spécifique de la plante et/ou du bioagresseur.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériel végétal utilisé

La tomate (*Solanum lycopersicum*) a été la plante étudiée dans la totalité de mes travaux de thèse.

Nous avons utilisé la variété indéterminée naine (ou à entre-nœuds courts) Better Bush commercialisée par Park seed (Reimer seed). Cette variété est une hybride (F1) qui possède une architecture plus développée et plus simple que les variétés déterminées. Cela facilite les récoltes et les mesures (mesures d'échanges gazeux, par exemple). Son type nain lui confère une taille intermédiaire idéale en expérimentation pour gérer l'encombrement spatial des cultures, en évitant les longueurs finales de tiges des variétés indéterminées (jusqu'à dix mètres parfois). De plus, le but de cette étude étant de comprendre la réponse de la tomate aux contraintes environnementales, nous avons choisi cette variété qui réagit fortement à une limitation en azote. Selon Larbat *et al.* (2012a), l'effet positif de la limitation azotée sur les concentrations en composés de défenses étudiés est significatif pour cette variété.

2. Dispositifs de culture

Pour la totalité des expérimentations, nous avons utilisé un dispositif de culture hydroponique. A l'INRA de Champenoux (54), les plantes sont cultivées sous serre et à l'INRA d'Avignon (84), en phytotron. Ces dispositifs diffèrent par quelques caractéristiques en fonction du lieu de culture.

2.1. Dispositif de culture en serre à l'INRA de Champenoux

2.1.a. Description du dispositif de germination

La germination est réalisée en phytotron. Un bac de 21 cm de hauteur est rempli de solution nutritive complète (non limitante pour la croissance de la plante). Il est recouvert d'une plaque en PVC percée d'orifices de 2 cm de diamètre (Figure 21.A) qui peuvent chacun accueillir un poquet : un tube PVC de 4 cm de longueur possédant une grille à maille de nylon non soudées (permettant à la plante de se développer sans être restreinte) à sa base (Figure 21.B). Chaque graine est disposée sur la grille d'un poquet. Une bague autour de chaque poquet permet de régler la hauteur de la grille pour que la solution nutritive affleure toujours le fond du tube (Figure 21.B). Les plantules se développent pendant 12 jours sur ce dispositif. Les conditions de germination sont les suivantes : 75% d'humidité, obscurité pendant les trois premiers jours, ensuite, 16h de photopériode à 23°C et 8h de nuit à 18°C.

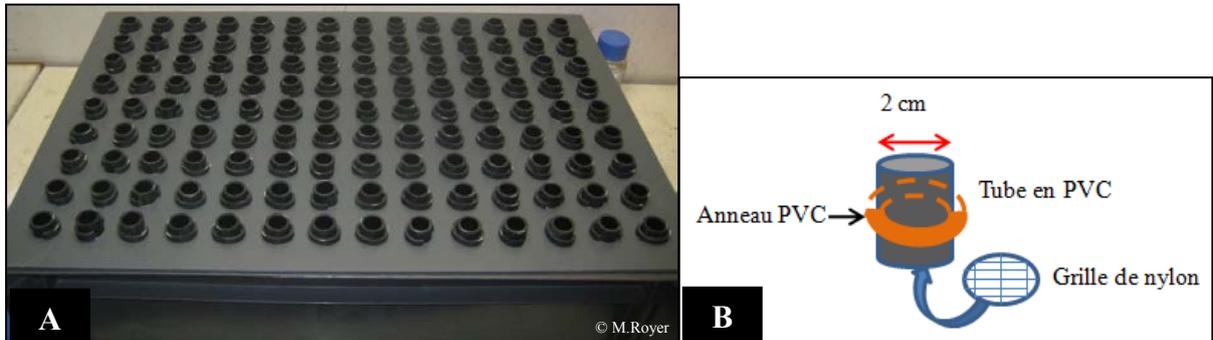


Figure 21: A: Bac de germination recouvert d'une plaque percée d'orifices accueillant les poquets – B : Schéma d'un poquet

2.1.b. Description du dispositif de culture hydroponique

Lorsque les cotylédons émergent des poquets (Figure 22 - après environ 12 jours), l'ensemble poquet + grille est transféré sur des supports de culture hydroponique en serre.



Figure 22: Plantules prêtes pour le transfert sur le dispositif en serre – Cotylédons émergeant du poquet – bague en PVC autour du poquet permettant de régler la hauteur.

Un système hydroponique comprend un bac rempli de 80 litres de solution nutritive, un support hydroponique de 3 m de longueur et de dimensions 12x12 cm percé d'orifices pour disposer les plantes et un tube de même longueur permettant d'acheminer la solution nutritive (Figure 23). Dix plantes en moyenne sont installées sur un même système hydroponique.

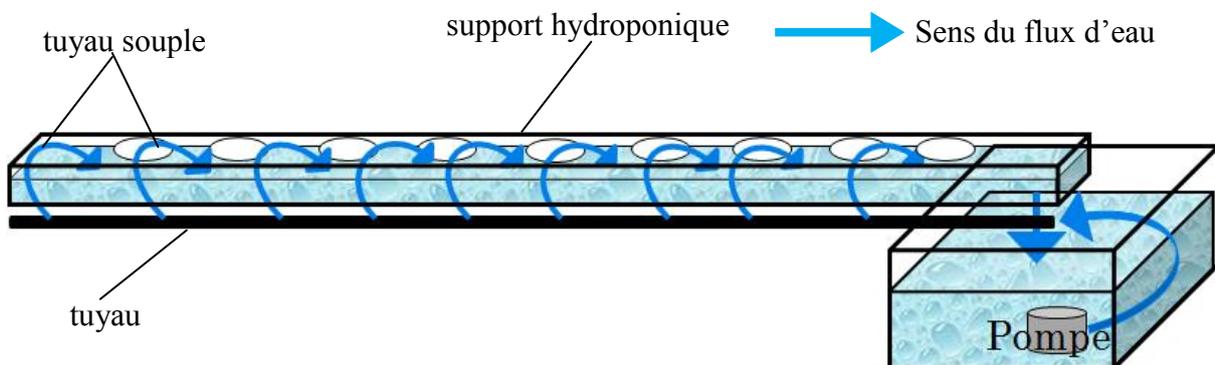


Figure 23: Schéma du dispositif hydroponique

Des tuyaux souples relient le tube au support hydroponique sur toute la longueur. La solution nutritive est en circulation constante durant la culture grâce à une pompe d'aquarium (modèle HX 6530, 1750 litres/heure, Hailea, Guangdong, Chine). Les plantes sont disposées directement avec leur poquet sur des plaques (10x12 cm) posées sur le support (Figure 24).

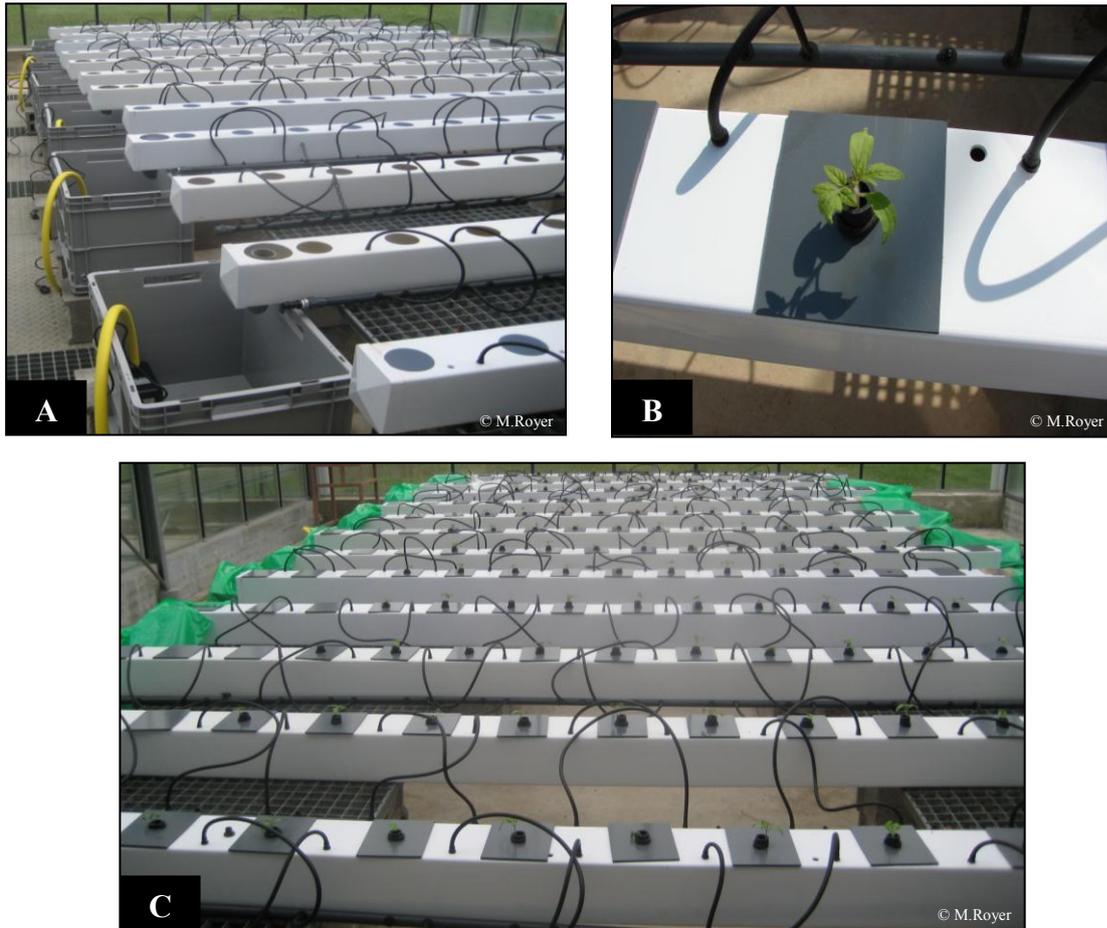


Figure 24: Photos du dispositif de culture hydroponique. A. Les supports hydroponiques (blancs) reliés au tube noir par des tuyaux souples. B. Le poquet placé sur une plaque PVC elle-même placée sur l'orifice du support hydroponique. C. Les plantes en place sur le dispositif - les bacs sont couverts d'une bâche opaque pour éviter la prolifération d'algues à la lumière

2.1.c. Facteurs étudiés : fertilisation azotée et concentration en CO₂ atmosphérique

Nous avons réalisé cette expérimentation dans deux serres mitoyennes, ce qui a permis d'avoir deux modalités pour le facteur concentration en CO₂ : l'une à atmosphère ambiante (350 vpm CO₂), l'autre à atmosphère enrichie en CO₂ (700 vpm).

Selon Le Bot *et al.* (2009), la concentration en azote de 0.3 mM est la concentration limite entre une fertilisation pléthorique et une fertilisation limitante pour la plante, dans le cas d'une culture hydroponique à fort débit de circulation avec un contrôle régulier de la concentration en azote du milieu. Nous avons donc choisi les concentrations en fonction de ces résultats. Deux niveaux d'azote sont testés : pléthorique pour la plante (HN = 7 mM) ou limitant pour la croissance (LN = 0.1 mM). Pour chaque niveau, l'azote est apporté soit par du nitrate pur (N_{nit}), soit par un mélange nitrate/ammonium (N_{mix} = [N:NO₃/NH₄] = 70/30) (Figure 25). Les traitements sont disposés en trois blocs placés perpendiculairement à l'axe porte-fond de la serre.

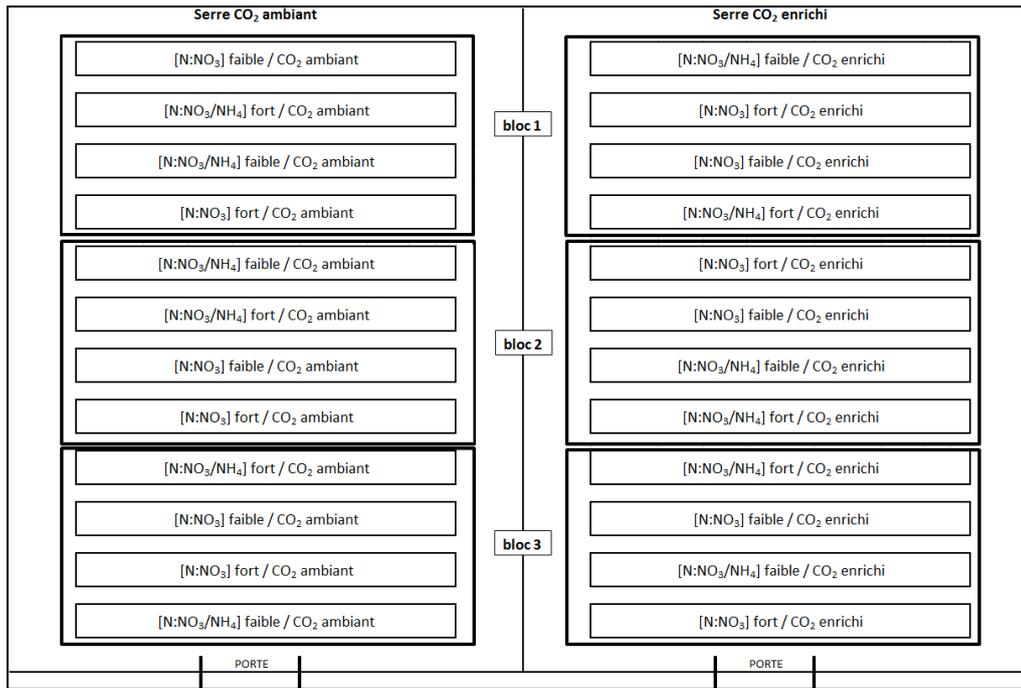


Figure 25: Disposition en bloc des plantes dans les serres

2.1.d. Préparation des solutions nutritives

Les solutions nutritives sont préparées avec de l'eau du réseau et des sels. Sur notre site expérimental, la concentration en nitrate de l'eau est égale à 0,045 mmol.L⁻¹ (mM). Nous prenons en compte cette valeur pour préparer les solutions nutritives contenant une faible concentration en azote. Quatre solutions nutritives différentes sont nécessaires : 0.1 mM N-NO₃⁻ ; 7 mM N-NO₃⁻ ; (0.07 mM N-NO₃⁻, 0.03 mM N-NH₄⁺) ; (4.9 mM N-NO₃⁻, 2.1 mM N-NH₄⁺). L'ion sulfate a été choisi pour maintenir la charge anionique des solutions LN et HN au même niveau. Ce choix est justifié par la bonne tolérance de la tomate à ces concentrations de sulfate (Lopez *et al.*, 1996). C'est pourquoi, à des fins de comparaison, toutes ces solutions proposent une somme nitrate + sulfate (NO₃⁻ + SO₄²⁻) égale à 12 meq.L⁻¹. La composition des solutions est présentée dans le Tableau 2. La composition de la solution d'oligo-élément concentrée est présentée dans le Tableau 3. Nous avons ajouté 0.3 ml de cette solution d'oligo-éléments par litre de solution nutritive. Le pH de ces solutions nutritives est ajusté entre 5 et 5.5 au début de l'expérimentation (modèle pH100, VWR).

[N] des solutions nutritives	KH ₂ PO ₄	K ₂ SO ₄	Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	CaSO ₄ , 2H ₂ O	MgSO ₄ , 7H ₂ O	NH ₄ NO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄	EDTA-Fe, 2H ₂ O
0.1 mM [N-NO ₃ ⁻]	10,887	13,940	0,520	47,518	29,576	/	/	1,386
7 mM [N-NO ₃ ⁻]	10,887	13,940	66,122	/	29,576	/	/	1,386
7 mM [70 NO ₃ ⁻ :30 NH ₄ ⁺]	10,887	10,455	26,449	25,481	24,647	13,447	/	1,386
0.1 mM [70 NO ₃ ⁻ :30 NH ₄ ⁺]	10,887	13,940	0,236	48,035	29,576	/	0,159	1,386

Tableau 2: Composition des solutions nutritives selon la concentration en azote. Masse des sels en g pour 80 litres de solution.

Solutions oligo-éléments	Na ₂ MoO ₄	MnCl ₂ , 4H ₂ O	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	CuSO ₄ , 5H ₂ O	H ₃ BO ₃	EDTA-Fe, 2H ₂ O
pour 1 L de solution	0.2270	7.6852	3.1080	0.3929	4.2512	14.4359

Tableau 3: Composition de la solution mère d'oligo-éléments. Masses des sels en g pour 1 litre de solution d'oligo-éléments. Ajout de 0.3 ml de solution d'oligo-éléments par litre de solution nutritive.

2.1.e. Contrôle des conditions de culture

Nous avons réalisé cette expérimentation durant les mois d'avril et mai 2010. Les paramètres climatiques tels que la température, le rayonnement est mesuré toutes les 10 secondes puis moyenné par 30 minutes par une centrale d'acquisition reliée à un ordinateur. Les températures minimale et maximale atteintes dans les serres sont 18°C et 25°C. La pression partielle de CO₂ est mesurée dans les deux serres et régulée dans la serre enrichie (700 vpm CO₂) avec un analyseur de gaz à infra-rouge (ADC 225 MK3, Hoddesdon, Royaume-Uni) et un débitmètre massique relié à des bouteilles de CO₂.

Le pH des solutions est mesuré tous les deux jours du 6 au 30 avril puis tous les jours jusqu'au 10 mai. Une solution de H₂SO₄ 1N ou de NaOH 1N est ajoutée pour maintenir le pH entre 5 et 6. Nous avons mesuré et ajusté la hauteur de la solution nutritive dans les cuves avec une fréquence similaire à la mesure du pH. La concentration en nitrate est mesurée manuellement par spectrophotométrie (Vercambre et Adamowicz, 1996) avec une fréquence similaire à la mesure du pH. L'ajout d'une solution de nitrate 1N composée de KNO₃, Mg(NO₃)₂ et Ca(NO₃)₂ permet de maintenir la concentration en nitrate au niveau souhaité. Pour les solutions où cela est nécessaire, l'ajustement en ammonium est réalisé selon la quantité de nitrate ajouté, avec une fréquence similaire, par l'addition d'une solution de (NH₄)₂SO₄ 1N.

2.1.f. Méthode d'échantillonnage

Pour éviter tout stress mécanique, les plantes ne sont pas manipulées jusqu'à leur récolte. Trois récoltes ont eu lieu au cours de la culture : 27 jours, 35 jours et 47 jours après semis (JAS) correspondant à trois stades phénotypiques différents : stade végétatif, apparition des boutons floraux, floraison.

Avant la récolte à 47 JAS, le taux d'assimilation nette de CO₂ et le taux de transpiration d'une feuille développée et d'une feuille récemment apparue de chaque plante sont mesurés à l'aide d'un système de photosynthèse portable (CIRAS-1, PP systems, Hitchin, Royaume-Uni) équipé d'une lampe halogène contrôlant le PAR à 700 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A chaque récolte, 1 plante par répétition est échantillonnée (Figure 26). La surface foliaire totale est mesurée à l'aide d'un planimètre Li-3100 C (Li-Cor, Lincoln Nebraska, USA). Les plantes sont séparées en 4 parties (3 premières plus jeunes feuilles développées = feuilles en développement, feuilles développées, tiges et racines), sauf pour la première récolte (27 JAS) où les deux types de feuilles sont regroupés. La biomasse fraîche de chaque partie est pesée et les échantillons sont congelés dans de la carboglace.

Après lyophilisation (Lyovac GT2, Steris), les biomasses sèches sont pesées et les échantillons sont broyés en poudre avec un broyeur à bille (Retsch MM200). En attendant les différentes analyses, les échantillons broyés sont conservés dans une étuve à 27°C.

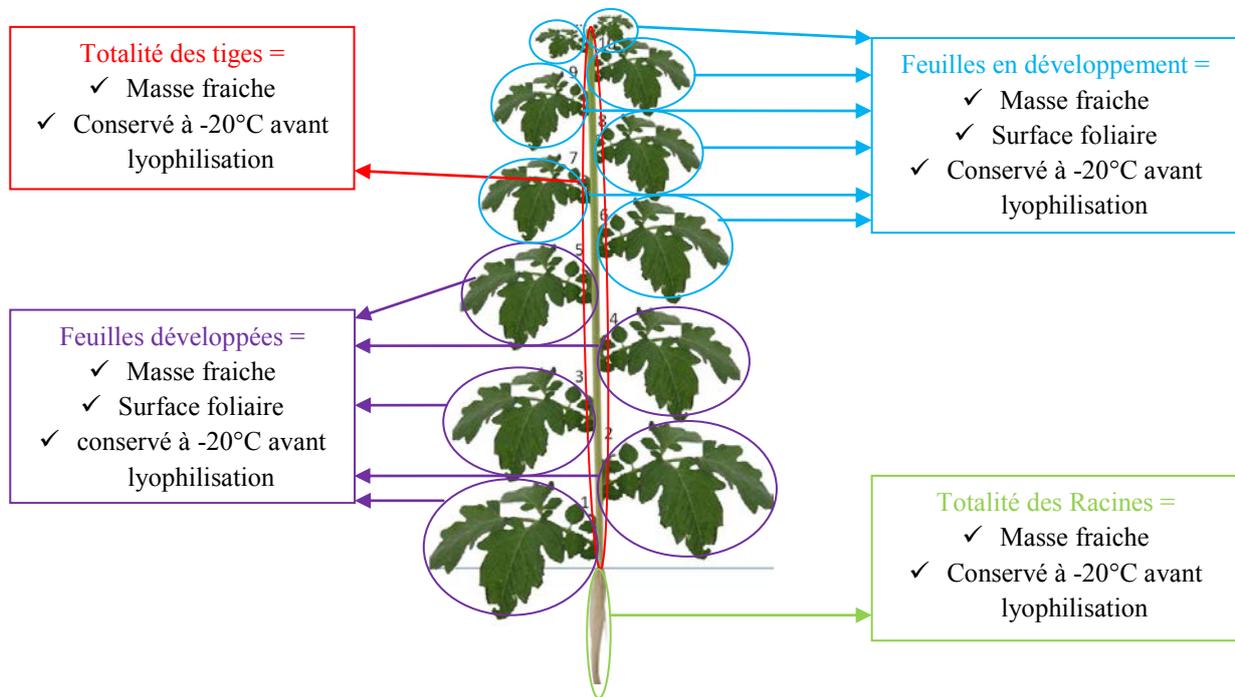


Figure 26: Schéma d'échantillonnage de l'expérimentation à l'INRA de Champenoux.

2.2. Dispositif de culture en phytotron à l'INRA d'Avignon

Le dispositif de culture à Avignon a été utilisé pour trois expérimentations en présence de bioagresseurs. Selon le bioagresseur étudié, le protocole cultural a été adapté, dans le but de favoriser l'infection. Dans cette partie, certains paragraphes seront communs aux trois expérimentations, et d'autres détailleront les caractéristiques pour chaque expérimentation.

2.2.a. Description du dispositif de germination

La germination est réalisée dans un phytotron. Les graines sont placées sur un système NFT (nutrient film technique). Des poquets de 1 cm de diamètre et de 4 cm de longueur avec une grille de nylon au fond sont utilisés pour soutenir la graine. Un film de solution s'écoule continuellement à l'affleurement de la grille. Une bague permet de régler la hauteur des poquets (Figure 27).



Figure 27: Dispositif de germination en Avignon

La solution nutritive utilisée est le mélange LN (0.15 mM N) de la culture. Sa composition est détaillée au chapitre 2.2.d.

Les plantules se développent 10 jours sur ce dispositif puis sont transférées sur le dispositif de culture. Les conditions de germination sont les suivantes : 85% d'humidité les 5 premiers jours, 60% d'humidité les 5 derniers jours ; la température est maintenue à 25°C ; l'obscurité est maintenue les trois premiers jours. Du quatrième au septième jour, un quart des lampes est allumé. Le septième jour, la moitié des lampes est allumé. Le huitième jour, les trois-quarts des lampes sont allumés. Le neuvième jour, toutes les lampes sont allumées. La photopériode est de 12 heures.

2.2.b. Description du dispositif de culture hydroponique

Le système hydroponique "nutrient film technique" est composé d'un ensemble de tubes PVC de 2 m de longueur et 3.2 cm de diamètre. Ces tubes sont percés pour recevoir les plantes (Figure 28).



Figure 28: Dispositif de culture hydroponique en phytotron

Quatre systèmes comprenant de 18 à 20 tubes sont disposés deux par deux dans les deux phytotrons jumeaux. Une pompe alimente en continu chaque tube avec une solution nutritive recyclée en permanence (débit : 0.6 L.min⁻¹).

2.2.c. Facteurs étudiés : fertilisation azotée et présence de bioagresseurs

Nous avons réalisé cette expérimentation dans deux phytotrons. Les traitements placés dans chaque phytotron sont identiques. Deux concentrations d'azote sont dispensées dans chaque phytotron : 1.5 mM d'azote (HN), concentration non limitante pour la croissance et 0.15 mM d'azote (LN), concentration limitante. Au cours de l'expérimentation, la concentration limitante est ajustée pour que l'absorption des plantes limitées soit égale à 30% de celle des plantes non limitées. Les répétitions sont placées en 3 blocs dans chaque phytotron.

Le nombre de répétitions et les modalités choisies sont présentés, en fonction du bioagresseur étudié (mode d'inoculation, zone d'inoculation...).

2.2.c.i. Expérimentation sur les bactéries *Pseudomonas syringae* et *Pseudomonas corrugata*

Dans chaque phytotron, les deux modalités du facteur « fertilisation azotée » sont présentes : plantes poussant sur une solution LN ou poussant sur une solution HN. Le facteur « présence de *Pseudomonas* » présente quatre modalités : inoculation des feuilles par *Pseudomonas syringae*, inoculation des tiges par *Pseudomonas corrugata*, témoin *syringae* (i.e. inoculation des feuilles par de l'eau stérile) ou témoin *corrugata* (i.e. inoculation des tiges par de l'eau stérile). Les types d'inoculation n'étant pas identiques selon l'espèce bactérienne (inoculation des tiges ou des feuilles), deux types de plantes témoins sont nécessaires (Figure 29). Par phytotron, nous disposons 6 plantes par traitement. Les répétitions sont disposées en bloc.

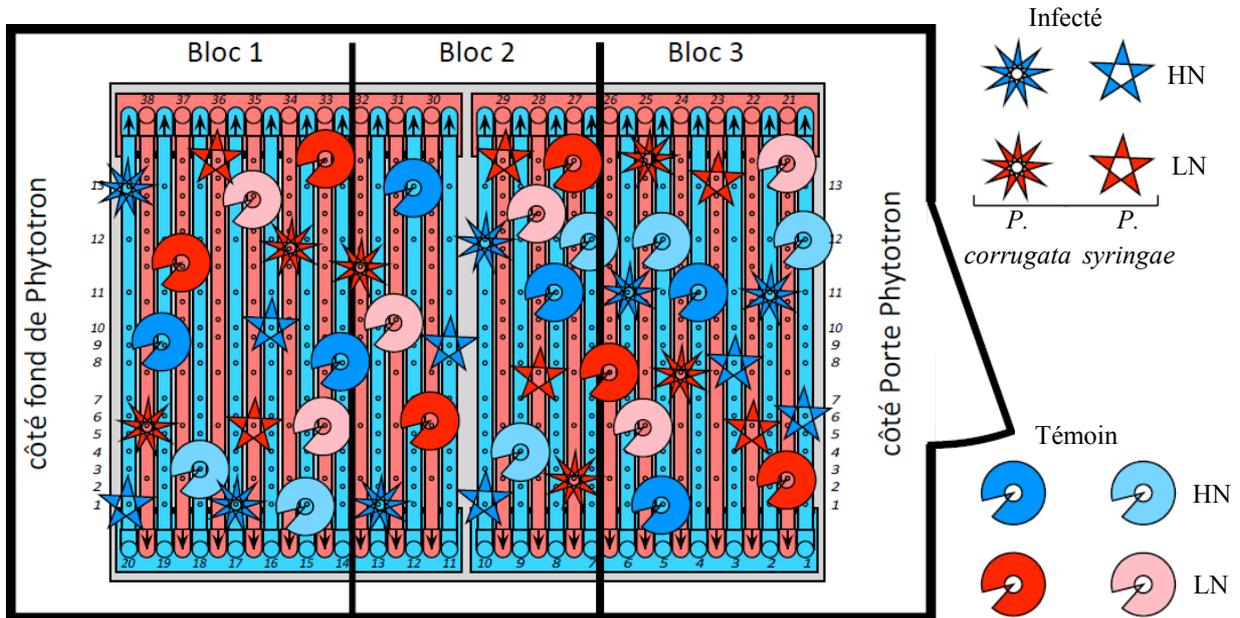


Figure 29 : Disposition des traitements de l'expérimentation *Pseudomonas* dans un des deux phytotrons. La disposition est la même dans le deuxième phytotron - D'après S. Adamowicz (INRA Avignon)

2.2.c.ii. *Expérimentation sur l'insecte Tuta absoluta*

Dans chaque phytotron, les deux modalités du facteur « fertilisation azotée » sont présentes : plantes poussant sur une solution LN ou poussant sur une solution HN. Le facteur « présence de *Tuta absoluta* » présente aussi deux modalités : inoculation par *T. absoluta* ou témoin. Par phytotron, nous disposons 15 répétitions (= plantes) inoculées et 3 répétitions témoin par niveau d'azote (Figure 30). Les répétitions sont disposées en bloc.

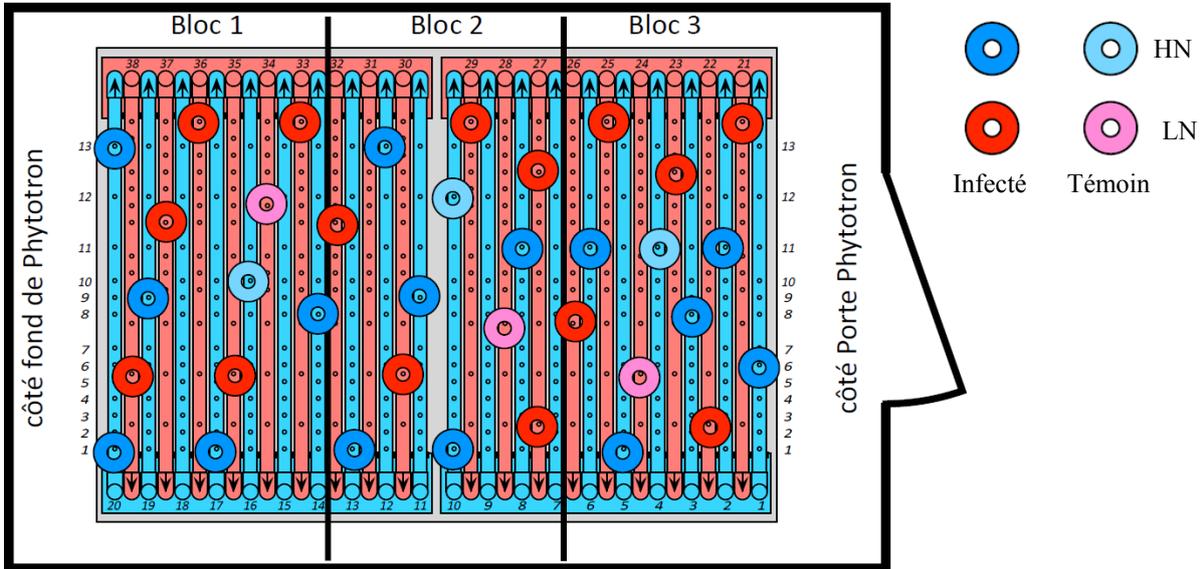


Figure 30: Disposition des traitements de l'expérimentation *Tuta absoluta* dans un des deux phytotrons. La disposition est la même dans le deuxième phytotron - D'après S. Adamowicz (INRA Avignon)

2.2.c.iii. *Expérimentation sur le champignon Botrytis cinerea*

Dans chaque phytotron, les deux modalités du facteur « fertilisation azotée » sont présentes : plantes poussant sur une solution LN ou poussant sur une solution HN. Le facteur « présence de *Botrytis cinerea* » présente trois modalités : inoculation par une souche très virulente de *Botrytis cinerea*, inoculation par une souche peu virulente de *Botrytis cinerea* ou témoin (Figure 31).

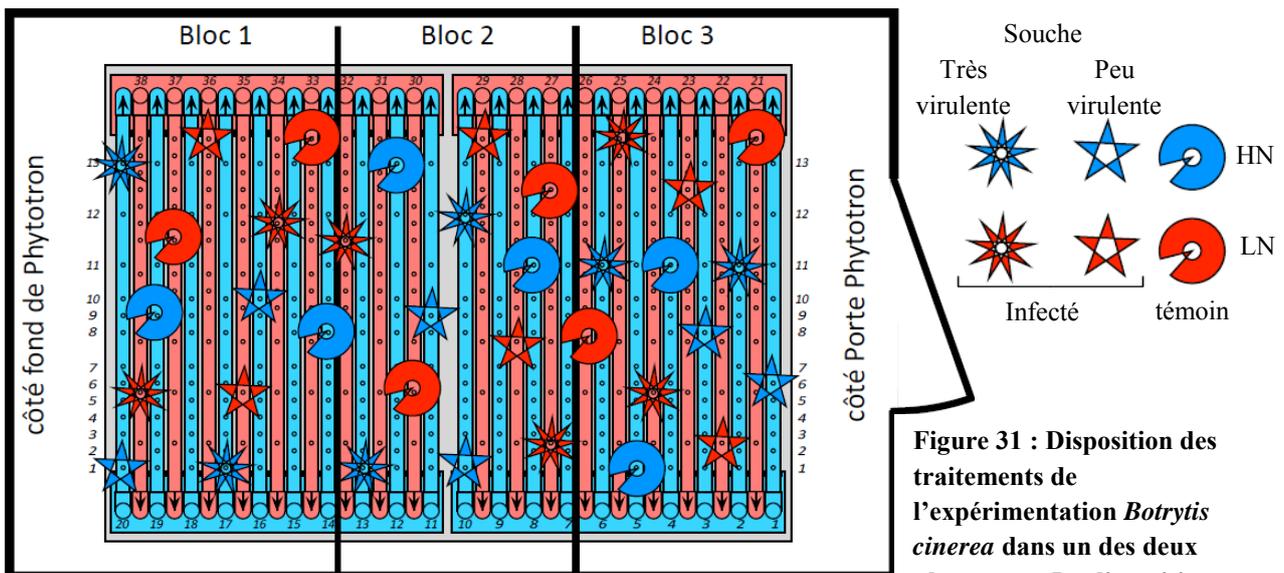


Figure 31 : Disposition des traitements de l'expérimentation *Botrytis cinerea* dans un des deux phytotrons. La disposition est la même dans le deuxième phytotron - D'après S. Adamowicz (INRA Avignon)

2.2.d. Préparation des solutions nutritives

Les solutions nutritives sont réalisées à partir d'eau déminéralisée et de sels. Pour les deux solutions, la somme nitrate + sulfate ($\text{NO}_3^- + \text{SO}_4^{2-}$) est égale à 12 meq.L^{-1} . La composition des solutions est présentée dans le Tableau 4. Les oligo-éléments sont apportés par une solution commerciale Kanieltra (contenant 6 Fe, HydroAzote, France) à 0.1 mL.L^{-1} de solution nutritive complète. Le pH des deux solutions est ajusté à 5 au début de l'expérimentation. Les solutions sont tempérées à 25 ou 21°C suivant la température de l'air.

[N] des solutions nutritives	KH_2PO_4	K_2SO_4	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	EDTA-Fe, $2\text{H}_2\text{O}$
0.15 mM [N]	0.136	0.174	0.018	0.590	0.370	0.017
1.5 mM [N]	0.136	0.174	0.177	0.474	0.370	0.017

Tableau 4: Composition des solutions nutritives selon la concentration en azote. Masses de sels en g nécessaires pour 1 litre de solution.

2.2.e. Contrôle des conditions de culture

La photopériode est de 16 heures. La température est de 25°C et l'humidité de 60% au début de l'expérimentation. Selon le bioagresseur étudié, l'humidité et la température sont modifiées ou non pour permettre un développement optimal du parasite. Pour l'expérimentation avec *Tuta absoluta*, les conditions sont restées identiques tout au long de la culture. Pour *Botrytis cinerea* et *Pseudomonas*, nous avons modifié l'humidité et la température une semaine avant l'inoculation du pathogène, l'humidité est augmentée à 90% et la température est baissée à 21°C.

L'interface automatique Totomatix (Adamowicz *et al.*, 2012) nous a permis de mesurer et d'ajuster le pH, la concentration en azote et la hauteur d'eau (*i.e.* le volume) des solutions dans le réservoir principal toutes les heures. Le pH est ajusté avec une solution 1N de H_2SO_4 et la concentration en azote avec une solution de nitrate 1N composée de 3 sels (identique à la solution citée au paragraphe 2.1.e.). La concentration en azote de la solution LN peut donc être ajustée en permanence avec cette interface pour que l'absorption des plantes limitées soit égale à 30% de celle des plantes non limitées (Figure 32). En pratique, l'ajustement a été quotidien, basé sur le cumul journalier d'absorption.

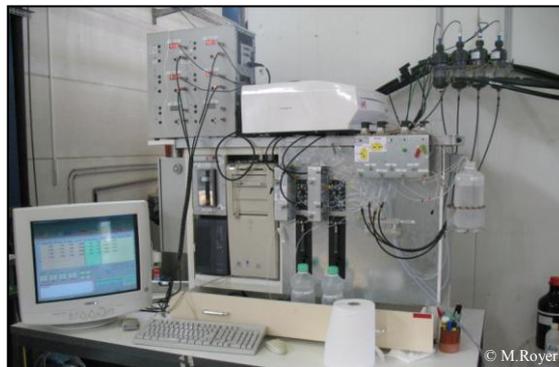


Figure 32: Interface automatique "Totomatix" d'ajustement du pH, de la concentration en azote et de la hauteur d'eau des cuves.

Au cours des expérimentations, la concentration en phosphate des solutions est mesurée manuellement grâce à un kit de dosage (Hanna - méthode Phosphate gamme haute – Réactifs HI-93717A-0 et HI-93717B-0). La concentration est ajustée si nécessaire grâce à une solution tampon phosphate (0.6 M phosphate – pH 5.5) pour éviter une limitation en cet élément.

2.2.f. Méthode d'inoculation des bioagresseurs

2.2.f.i. Méthode d'inoculation d'une suspension de bactérie *Pseudomonas*

Nous avons utilisé deux espèces de la bactérie *Pseudomonas* pour l'inoculation : *Pseudomonas corrugata*, agent de la maladie de la moelle noire, et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agent de la moucheture bactérienne. La souche de *P. syringae* pv. *tomato* utilisée est la souche DC3000 initialement isolée en 1960 d'une culture de tomate dans l'île de Guernesey (Buell *et al.*, 2003). La souche de *P. corrugata* utilisée est la souche CFBP 5307 initialement isolée en France en 1980, gracieusement fournie par le Dr C. Morris (INRA-Avignon).

L'inoculum est obtenu par la culture de la souche sur un milieu KBC (milieu King B modifié; Morris *et al.*, 2008) pendant 48h à 22-25°C. La concentration finale de la suspension aqueuse de bactéries appliquée sur les plantes est d'environ 10^8 cellules.ml⁻¹. Cette concentration est ajustée par dosage en densité optique (Morris *et al.*, 2008).

Deux types d'inoculation sont mis en œuvre. Pour *Pseudomonas corrugata*, la suspension de bactéries est injectée au centre de la tige alors que pour *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, la suspension est infiltrée sur la face inférieure de cinq folioles d'une feuille.

Les inoculations ont été réalisées 26 jours après semis. Après avoir fait un trou de 5 mm de longueur avec un cône de pipette, 10 µl de suspension de bactérie *P. corrugata* sont injectés dans la partie de tige située entre les feuilles N°4 et 5. A l'aide d'une seringue sans aiguille, 100 µl de suspension de bactérie *P. syringae* sont infiltrés dans cinq folioles de la feuille N°4 par la face inférieure. Immédiatement après, la zone infiltrée est délimitée au feutre.

Pour les plantes témoins, le même volume d'eau est injecté soit dans la tige, soit dans la feuille N°4.

2.2.f.ii. Méthode d'inoculation d'œufs de *Tuta absoluta*

- Obtention des œufs de *Tuta absoluta* à l'INRA de Sophia-Antipolis

Des individus collectés en serre à l'INRA d'Alenya ont permis de mettre en place une colonie de *Tuta absoluta* au laboratoire de l'INRA de Sophia-Antipolis (N. Desneux, URIH). Ces individus sont élevés en chambre de culture (25 ± 1°C, 70 ± 10% hr, 16h de photopériode). Les adultes sont gardés dans des cages (55x75x80 cm) contenant des plants de tomate. Les œufs sont obtenus en libérant, pendant une nuit, 15 individus (mâles et femelles mélangés) sur une foliole de tomate dans un tube en plastique, fermé avec une maille pour assurer la ventilation.

Le pétiole de la foliole dépassant du tube est planté dans une mousse florale pour l'arrosage. Au matin, les individus adultes sont enlevés et les œufs de *Tuta absoluta* de couleur blanc

crème (0.35 mm de longueur et 0.20 mm de largeur) collés sur la foliole peuvent être utilisés pour l'expérience. Ils sont transportés de l'INRA de Sophia-Antipolis jusqu'à l'INRA d'Avignon dans les tubes (Figure 33).

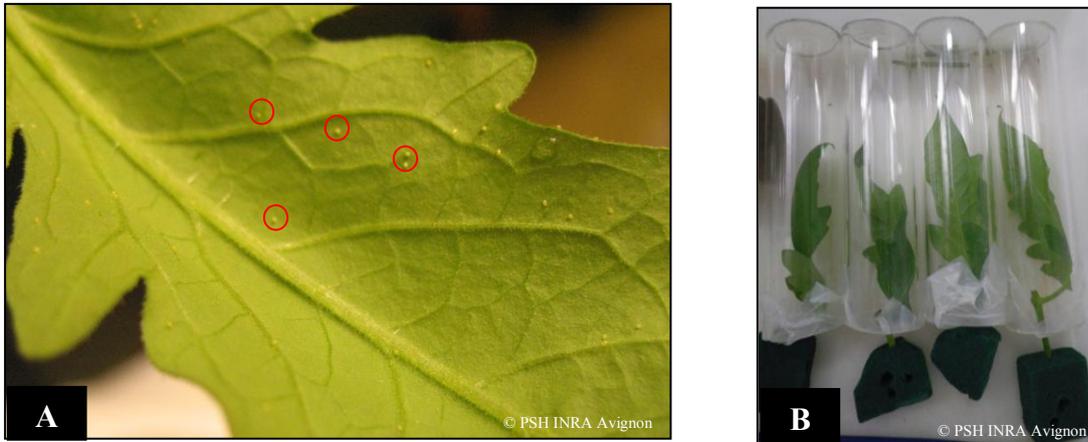


Figure 33: A. Oeufs de *Tuta* sur la face inférieure d'une feuille. B. Mode de transport des oeufs de *Tuta*

A 23 jours après semis des tomates en phytotrons, un œuf est déposé sur la foliole terminale de la feuille N°5 en partant du collet (Figure 34.A). Cette feuille inoculée est ensachée dans une poche (30x20 cm) en voileage de type Organza, ce qui emprisonne l'insecte (Figure 34.B.). De même, les feuilles N°5 des plantes témoins sont ensachées.

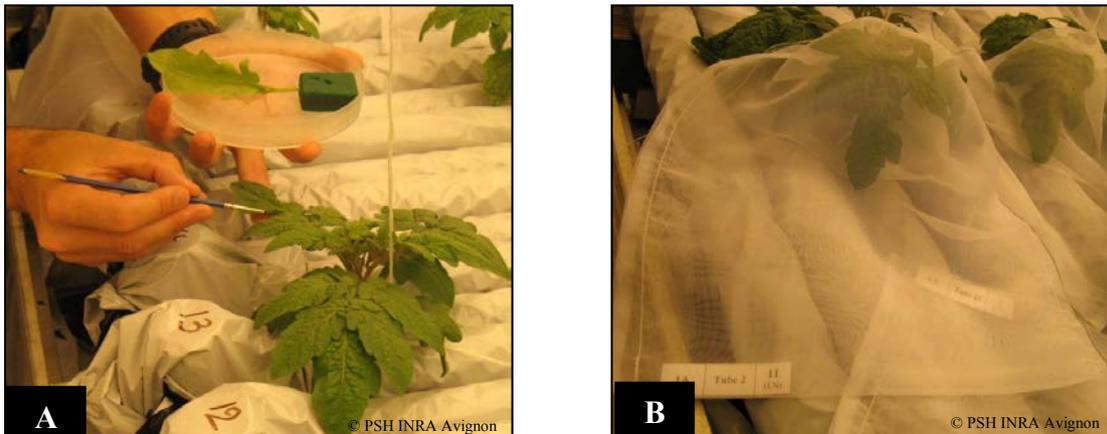


Figure 34 : A. Dépôt de l'œuf sur la foliole terminale de la feuille N°5. B. Feuille inoculée ensachée dans la poche en voileage. Plante identifiée par une étiquette déposée au fond de la poche

Après 16 jours de développement (soit 39 JAS) sur la plante, la larve ou puppe issue de l'œuf est pesée. Les différentes larves ou pupes sont transférées à l'INRA de Sophia-Antipolis sur les folioles inoculées. Ces folioles sont plantées dans de la mousse florale et placées individuellement dans des boîtes de Pétri. La mousse est arrosée avec la solution nutritive correspondante au traitement azoté (HN ou LN) jusqu'au stade de pupation. Nous avons collecté les données suivantes : la durée entre l'émergence de la larve et le passage au stade puppe, la durée du stade puppe jusqu'à la transformation en adulte. Durant cette période, les folioles sont placées dans une chambre climatique ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ humidité, 16h de photopériode).

2.2.f.iii. Méthode d'inoculation d'une suspension de spores de *Botrytis cinerea*

L'inoculum est obtenu par la culture de la souche sur milieu PDA (potato dextrose agar) dans des boîtes de Pétri incubées pendant 15 jours à 23°C jour et 18°C nuit. La photopériode est de 14 heures. Les conidies sont collectées en appliquant quelques ml d'eau distillée stérile sur la boîte de Pétri. La suspension obtenue est filtrée à 30 µm pour enlever les fragments mycéliens. Elle est ensuite agitée au vortex pendant 1 min avec 5 g de billes de verre pour séparer les spores entre elles.

La concentration finale de la suspension appliquée sur les plantes est 10^6 conidies.ml⁻¹. Un comptage sur cellule de Malassez est réalisé pour connaître la concentration de la solution mère et ajuster la solution fille à la concentration désirée.

Nous avons utilisé deux souches pour l'inoculation : BC1 (souche très agressive initialement isolée en 1989 d'une culture de tomate en serre, à Plougastel-Daoulas, Finistère; Decognet *et al.*, 2010) ou BC21 (souche peu agressive initialement isolée en 1991; Ajouz *et al.*, 2010). La feuille N°4 est coupée à 2 cm de l'insertion du pétiole. Dix microlitres de suspension à 10^6 spores.ml⁻¹ sont déposés sur la blessure (Figure 35). La feuille N°4 des plantes témoins est également coupée et 10 µl d'eau stérile sont déposés sur la blessure.



Figure 35 : Dépôt de 10µl de suspension de spores de *Botrytis cinerea* sur la blessure causée par la coupe de la feuille N°4 à 2cm de l'insertion du pétiole.

2.2.g. Mesures des échanges gazeux foliaires

Nous avons mesuré, à chaque récolte, le taux d'assimilation nette de CO₂, le taux de respiration, et le taux de transpiration à l'aide d'un appareil portable de mesure de photosynthèse (Li-Cor 6400, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) équipé d'un dispositif d'éclairage LED bleu-rouge délivrant la même intensité lumineuse active que celle mesurée dans les phytotrons (190 et 400 µmol photons.m⁻².s⁻¹ pour l'expérimentation sur *Pseudomonas* et sur *Tuta absoluta* respectivement). La mesure est réalisée sur la foliole terminale d'une feuille complètement développée la plus proche de la feuille infectée (N°4 ou 5 en partant du collet) (Figure 36).



Figure 36: Mesures d'échanges gazeux sur une foliole à l'aide de la chambre de l'appareil Li-Cor 6400. Le dispositif d'éclairage n'est pas installé sur la pince lors de la prise de vue.

2.2.h. Protocole d'échantillonnage

Nous avons adapté les protocoles d'échantillonnage des plantes en fonction du bioagresseur.

Les points communs sont : récolte de l'organe infecté (feuille ou partie de tige) pour étudier l'effet local de l'inoculation de chaque bioagresseur, une ou plusieurs feuilles dites « systémiques » adjacentes à la zone d'inoculation pour étudier l'effet systémique de l'inoculation des bioagresseurs, un échantillon de tige et de racines pour étudier l'effet de l'inoculation sur les autres organes de la plante.

2.2.h.i. *Echantillonnage de l'expérimentation « Pseudomonas »*

La moitié des plantes (48) est récoltée 1 jour après inoculation (27 JAS) et l'autre moitié 12 jours après l'inoculation (38 JAS).

A chaque récolte, une plante par traitement et par bloc est récoltée.

Pour les plantes infectées par *Pseudomonas corrugata*, une zone de tige est récoltée entre les feuilles N°4 et 5 (zone infectée) et pour les plantes infectées par *Pseudomonas syringae*, la feuille (Fi = N°4) est récoltée. Les feuilles dites « systémiques » (N°4 et 5 pour *Pseudomonas corrugata* et N°3 et 5 pour *Pseudomonas syringae*) sont récoltées. Les surfaces foliaires et les biomasses fraîches sont déterminées. Deux cylindres sont isolés sur la zone de tige inoculée par *Pseudomonas corrugata* et sur la feuille inoculée par *Pseudomonas syringae*, congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C. Une zone de tige et une autre de racine sont récoltées, pesées et conservées à -20°C (Figure 37).

A la deuxième récolte, les zones infectées (tiges ou feuilles) sont photographiées pour quantifier l'étendue des symptômes par traitement d'images.

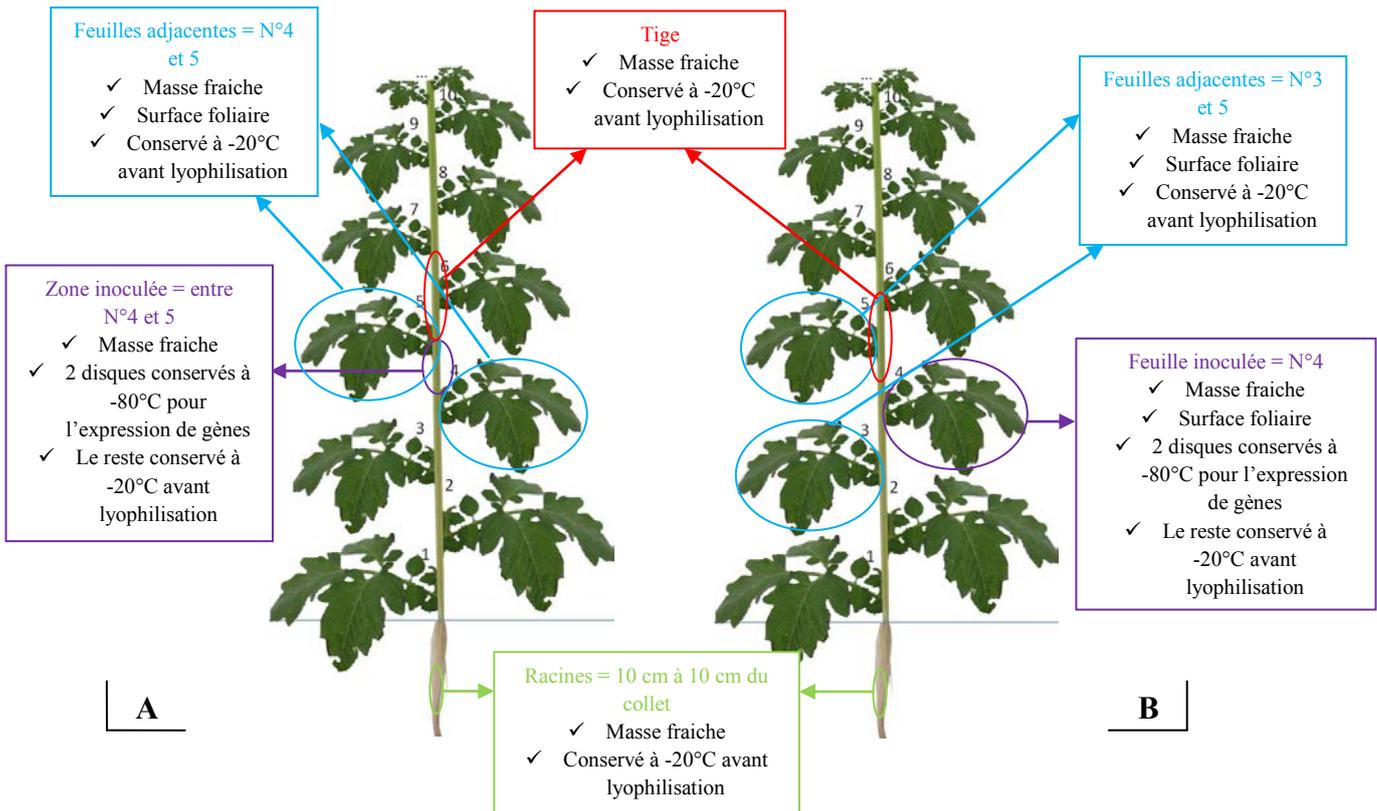


Figure 37: Schéma d'échantillonnage de l'expérimentation avec *Pseudomonas*. A : Echantillonnage lors de l'inoculation par *P. corrugata*. B : Echantillonnage lors de l'inoculation par *P. syringae*.

2.2.h.ii. Echantillonnage de l'expérimentation « *Tuta absoluta* »

Les plantes sont récoltées 39 jours après semis, soit 16 jours après l'inoculation des œufs de *Tuta*. Les parties racinaires et aériennes sont séparées et les parties aériennes sont pesées en frais.

Plusieurs organes sont détachés du plant et analysés séparément. Nous avons isolé la feuille infectée (Fi = Feuille N°5 en partant de la base de la tige) et séparé la feuille adjacente (N°6) et une feuille éloignée de la zone d'infection (N°8). Ensuite, un échantillon de tiges entre les feuilles N°5 et N°8, et un échantillon de racines de 10 cm de longueur sont récoltés.

Plusieurs traits morphologiques sont mesurés au moment de la récolte. Les surfaces foliaires de la feuille infectée et de la feuille adjacente sont mesurées avec un planimètre Li-Cor (Li-3000C, Lincoln, Nebraska, USA). La masse fraîche de tous les organes récoltés est déterminée. Sur la feuille infectée, deux disques foliaires sont récoltés, congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C pour l'analyse ultérieure de l'expression de gènes. Le reste des échantillons récoltés est congelé à l'azote liquide et conservé à -20°C. Le reste des parties aériennes non récoltées est pesé en frais puis placé à l'étuve à 70°C pendant 48 heures pour mesurer la masse sèche (Figure 38).

Nous avons photographié les feuilles infectées pour tenter de quantifier l'étendue des galeries faites par la larve de *Tuta* par traitement d'images.

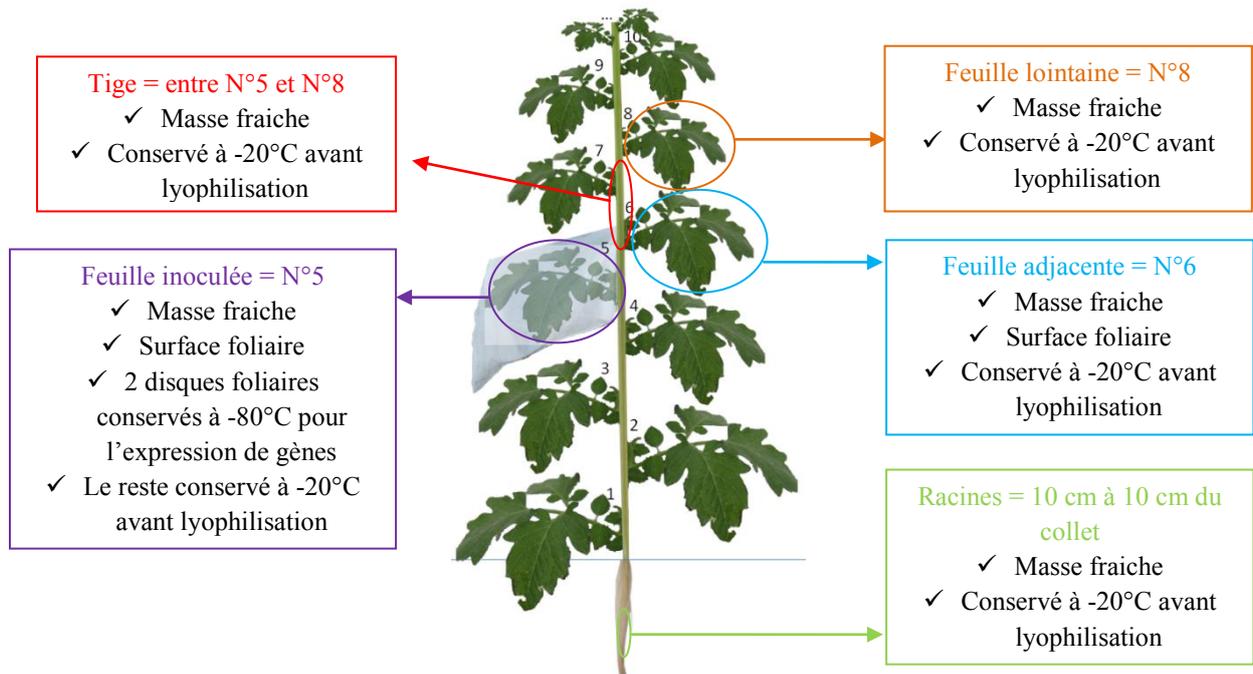


Figure 38: Schéma d'échantillonnage de l'expérimentation avec *Tuta absoluta*

2.2.h.iii. Echantillonnage de l'expérimentation « *Botrytis cinerea* »

La moitié des plantes (36) est récoltée 1 jour après inoculation (27 JAS) et l'autre moitié 7 jours après inoculation (33 JAS).

A chaque récolte, une plante par traitement et par bloc est récoltée.

La méthode d'échantillonnage des racines est identique à celle de l'expérimentation *Tuta absoluta*. Les parties aériennes sont pesées. Plusieurs organes sont détachés du plant et analysés séparément. Nous avons isolé la zone infectée (zone de la tige autour du pétiole N°4), deux feuilles dites « systémiques » (N°3 et 5), un échantillon de tiges et un échantillon de racines. La surface foliaire des feuilles dites « systémiques », et les biomasses fraîches de tous les organes récoltés sont déterminées. Sur la zone infectée et les feuilles dites « systémiques », deux disques sont récoltés, congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C pour l'analyse ultérieure de l'expression de gènes. Le reste des échantillons est congelé à l'azote liquide et conservés à -20°C. Les parties aériennes non récoltées sont pesées en frais puis séchées à l'étuve à 70°C pendant 48 heures pour obtenir la masse sèche (Figure 39).

Pour les échantillons des trois expérimentations, après lyophilisation (Lyovac GT2, Steris), les biomasses sèches sont mesurées et les échantillons sont broyés en poudre avec un broyeur à billes (Retsch MM200). En attendant les différentes analyses, les échantillons broyés sont conservés à -20°C.

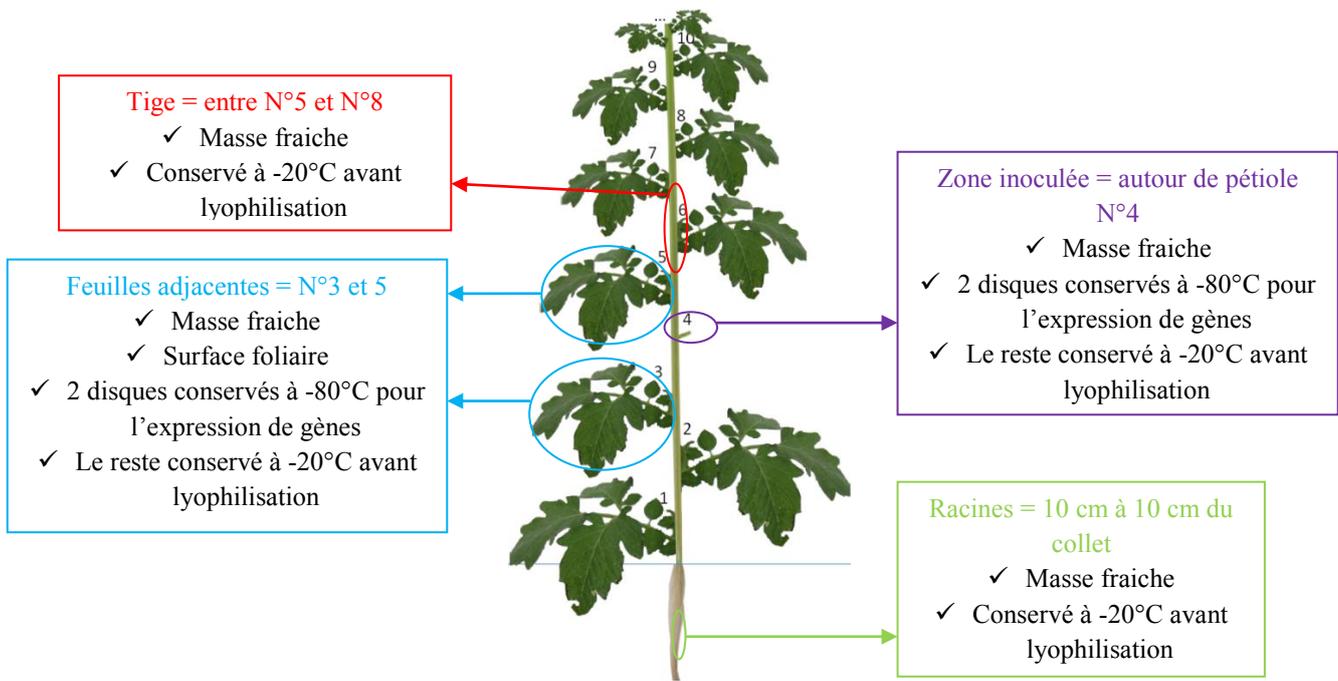


Figure 39: Schéma d'échantillonnage de l'expérimentation avec *Botrytis cinerea*

3. Analyses réalisées

3.1. Dosage du carbone et de l'azote totaux dans les tissus végétaux

Les concentrations de carbone et azote totaux dans la masse sèche sont déterminées à l'aide d'un auto-analyseur élémentaire Flash EA 1112 (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). Environ 3 mg de poudre d'échantillon lyophilisé sont pesés exactement dans une nacelle en étain. L'échantillon subit une combustion à haute température sous flux d'oxygène, pendant un temps très court, qui dégage des molécules de CO₂, H₂O, SO₂ et NO_x. Un flux d'hélium, gaz vecteur, transporte les gaz formés à travers une colonne de cuivre qui permet la réduction des oxydes d'azote en N₂ et de fixer l'O₂ en excès. Finalement, le CO₂ et le N₂ sont séparés par une colonne de chromatographie en phase gazeuse et sont détectés par un catharomètre. La calibration est réalisée à partir d'une gamme étalon d'acide aspartique (% C=36.05 et % N=10.52). Les résultats sont exprimés en % C et % N dans la masse sèche.

3.2. Dosage du nitrate et de l'ammonium dans les tissus végétaux

L'extraction à l'eau à 45°C pendant 1 heure est réalisée sur 20 mg de poudre d'échantillon lyophilisé. Après centrifugation (15 min à 10000 g) et filtration (filtre nylon 0.45 µm), l'extrait est analysé en chromatographie ionique (DX-320, Dionex, Sunnyvale, USA). La séparation du nitrate est réalisée par une colonne analytique AS11-HC de dimension 250x4 mm (Dionex IonPac) précédé d'une pré-colonne AG11 de dimension 50x4 mm (Dionex IonPAC). L'éluant utilisé est une solution de KOH 30 mM à un flux de 1 ml.min⁻¹. Un suppresseur ASRS permettant de supprimer la conductivité de l'éluant en échangeant les ions K⁺ avec H⁺ est utilisé juste avant que l'extrait passe dans un détecteur de conductivité. La séparation de l'ammonium est réalisée par une colonne analytique CS12A (Dionex IonPac) précédé d'une pré-colonne CG12A (Dionex IonPac). L'éluant utilisé est une solution d'acide

méthylsulfonique 20 mM à un flux de 1 ml.min⁻¹. Un suppresseur CRSR permettant de supprimer la conductivité de l'éluant grâce à des ions OH⁻ est utilisé juste avant un détecteur de conductivité. Un étalonnage est réalisé grâce à des solutions de concentrations en nitrate ou ammonium connues. Les résultats sont exprimés en % de N sous forme NO₃ ou NH₄ dans la masse sèche.

3.3. Analyse des composés primaires

3.3.a. Extraction et dosage des glucides simples (glucose, fructose, saccharose)

Dix milligrammes de poudre d'échantillon lyophilisé sont incubés avec 1 ml d'éthanol 80% à 80°C pendant 30 min. Le surnageant est récupéré par centrifugation (10 min à 12100 g) puis l'opération est répétée. Le culot issu de la seconde centrifugation est conservé à -20°C pour le dosage d'amidon. Les 2 ml de surnageant récupérés sont évaporés à l'aide d'un SpeedVac[®] (RC 10.10, Jouan) pendant 12h. Le culot est conservé à -20°C en attendant le dosage des glucides simples.

▪ Dosage par kit enzymatique des échantillons issus de l'expérimentation à Champenoux

Le culot est dissous avec 0.5 ml d'eau-ultra pure et la concentration de glucose, fructose et saccharose est déterminée dans 100 µl de cet extrait par un kit enzymatique (Enzytec Sucrose / D-Glucose / D-Fructose Réf 100286, R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne). Ce kit est basé sur la réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase qui transforme le glucose en glucose-6-phosphate. La réaction du glucose-6-phosphate avec le NADP⁺ produit du NADPH dont l'absorbance peut être mesurée en spectrophotométrie à 340 nm. Le dosage du fructose nécessite sa transformation en glucose-6-phosphate grâce à l'enzyme phosphoglucose isomérase. Pour le dosage du saccharose, sa transformation en glucose grâce la β-fructosidase est nécessaire pour ensuite suivre les mêmes réactions que le glucose libre. Le dosage du saccharose se fait séparément des dosages du glucose et fructose. La teneur en saccharose est calculée par la différence entre le glucose total (libre + issus du saccharose) et le glucose libre.

▪ Dosage par LC-MS des échantillons issus des expérimentations en Avignon

Le culot est dissous avec 1.5 ml d'eau ultra-pure à 4°C. L'extrait est agité au vortex et laissé au repos à 4°C pendant 10 min. Avant l'analyse en LC-MS, les phénols et les protéines solubles doivent être éliminés. Environ 10 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) sont ajoutés à l'extrait. Le PVPP a une forte affinité avec les polyphénols et permet de fixer les catéchines, les flavonols et les acides phénoliques. La fixation est réalisée pendant 15 min à 4°C en agitant au vortex toutes les 5 min. L'élimination du PVPP est faite par centrifugation à 16100 g pendant 10 min à 4°C. Les protéines solubles sont éliminées en ajoutant 450 µl de réactif de Courtonne (acétate de plomb trihydraté à 300 g.l⁻¹ d'eau distillée). Le mélange est agité et laissé reposer 5 min à 4°C. Un ajout d'une pointe de spatule de Na₂HPO₄ permet de précipiter le plomb en excès. L'extrait, après centrifugation (10 min, 7500 g) est filtré à 0.22 µm et congelé à -20°C en attendant l'analyse en LC-MS.

Les échantillons sont dilués par 10 fois puis 20 µl d'une solution de rhamnose (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) 10 mg.l⁻¹ sont ajoutés. Le rhamnose est utilisé comme étalon

interne pour l'analyse en HPLC-MS (LTQ-MS, Thermo Scientific, San Jose, Ca, USA). La quantification des aires de pics se réfère à une gamme de concentrations connues d'étalons de glucose (Fisher Scientific, Illkirch, France), fructose (Acros Organics, Noisy Le Grand, France) et saccharose (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France).

L'analyse en LC-MS est réalisée en suivant le protocole issu de Ricochon *et al.* (2011). Une colonne Polyamine II (250x4.6 mm, YMC, Dinslaken, Allemagne) est utilisée, précédée d'une pré-colonne (7.5x4.6 mm, YMC, Dinslaken, Allemagne).

3.3.b. Extraction et dosage de l'amidon

Le culot issu de l'extraction des glucides simples est placé pendant 10 min au SpeedVac® pour éliminer l'éthanol restant. Un ou 0.5 ml, selon l'organe, d'eau ultra-pure est ajouté sur le culot et agité au vortex. La solubilisation de l'amidon est réalisée par autoclave (1h à 1 bar). L'extrait est centrifugé à 12600 g pendant 2 min. Une pesée de l'entité « culot + tube » est réalisée avant l'ajout d'eau et une pesée de l'entité « culot + tube + eau » est réalisée après l'autoclave, ce qui permet d'obtenir par soustraction le volume exact d'extraction.

La concentration en amidon est déterminée sur 100 à 400 µl d'extrait en fonction de la concentration attendue en amidon, grâce à un kit enzymatique (Enzytec Starch Réf 1002942, R-Biopharm, Darmstadt, Allemagne). L'amidon est hydrolysé en glucose grâce à l'enzyme amyloglucosidase. Les étapes suivantes sont identiques à celles du kit enzymatique pour le dosage des glucides simples (voir 3.3.a.).

3.4. *Analyse de l'expression des gènes de biosynthèse et des concentrations en polyphénols et tomatine*

3.4.a. Dosage de l'expression de gènes de la voie des phénylpropanoïdes

Les disques foliaires congelés et conservés à -80°C sont broyés au mortier dans l'azote liquide. Ensuite, les ARN sont extraits en utilisant le kit RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen). Pendant cette extraction, l'ADN contaminant est dégradé par le biais d'un traitement DNase (kit RNase-Free DNase Set, Quiagen). La quantité d'ARN extraites est évaluée en spectrophotométrie par une mesure aux longueurs d'onde 260 et 280 nm et la qualité des ARN est vérifiée sur gel d'agarose.

Pour chaque échantillon, 1 µg d'ARN est retro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit High Capacity ADNc Archive (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La PCR (polymerase chain reaction) en temps réel est réalisée en utilisant un système PCR real time ABI StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), avec du Sybr green pour la détection. Le volume de réaction est de 20 µl contenant 10 µl de mastermix real time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et 25 ng d'ADNc.

Les niveaux d'expression de *PAL5*, *F3H*, *HQT* et *SIMYB12* sont déterminés en utilisant les amorces décrites précédemment (Løvdal *et al.*, 2010; Larbat *et al.*, 2012b). L'enzyme PAL est codée par une famille multigénique. Le gène *PAL5* est considéré comme le gène le plus activement transcrit codant pour la phenylalanine amonia lyase (PAL; Chang *et al.*, 2008;

Løvdal *et al.*, 2010). L'expression du gène *HQT* est essentiel à la synthèse de l'acide chlorogénique (Niggeweg *et al.*, 2004). Le gène *F3H* est impliqué dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes (De Jong *et al.*, 2004).

Nous avons identifié dans le génome de la tomate, deux séquences présentant des homologies avec la séquence codant une putrescine hydroxycinnamoyl transférase (*PHT*) chez la solanacée *Nicotiana attenuata* (NCBI JN390826) (utilisation de l'application « blast » sur le site Solgenomics : <http://solgenomics.net/>). Ces deux *PHT* putative de tomate, nommées *SIPHT1* et *SIPHT2* partagent 81% d'identité nucléotidique avec la *PHT* de *N. attenuata* et 95% entre elles. Deux couples d'amorces sont définies pour amplifier spécifiquement *SIPHT1* et *SIPHT2*. Les séquences des amorces pour *SIPHT1* sont : (F) CATTGATACTCTAATGGCTTTG et (R) CTAGGATGTAAGGAGAGCATA. Celles pour *SIPHT2* sont : (F) TCTAATGGCTCTAATATATGCCT et (R) ACTTCATCCAATGAGGTGTCC.

Les conditions d'amplification pour l'ensemble des gènes suivis sont les suivantes : 2 min à 50°C ; 10 min à 95°C ; 40 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C. L'expression de gènes pour chaque échantillon est calculé avec trois réplicats analytiques normalisés en utilisant le gène de référence *EF1a* (Løvdal et Lillo, 2009) avec le logiciel StepOne 1.2 (Applied Biosystems).

3.4.b. Choix de la méthode d'extraction combinée des polyphénols et glycoalcaloïdes

La méthode d'extraction classiquement utilisée au laboratoire a été mise au point par Bénard (2009). Cette méthode est spécifique pour l'extraction des polyphénols et utilise de l'éthanol 70% comme solvant d'extraction.

Nous avons voulu adapter la méthode pour extraire simultanément les polyphénols et le glycoalcaloïde tomatine, pour des économies de quantité d'échantillons et de temps (Annexe 1).

3.4.c. Extraction et analyse des polyphénols et glycoalcaloïdes des échantillons issus des expérimentations

L'extraction est réalisée sur 50 ou 20 mg de poudre lyophilisées. Cinquante microlitres de solution de taxifoline 2 mg.ml⁻¹ et 1 ml de méthanol 60% sont ajoutés. Le mélange est broyé pendant 1 min à l'ultra-turax puis centrifugé 10 min à 2400 g. Un millilitre de méthanol 60% est ajouté sur le culot. Après broyage et centrifugation, les deux surnageants sont regroupés et évaporés au SpeedVac[®] pendant une nuit. L'extrait sec est solubilisé dans 1 ou 0.5 ml de méthanol 70%, centrifugé 10 min à 13400 g et filtré à 0.45 µm dans un flacon HPLC. Les extraits sont conservés à -20°C avant l'analyse des polyphénols en HPLC.

Pour le dosage de la tomatine, 10 µl d'échantillon sont ajoutés dans 470 µl de méthanol 70%. Vingt microlitres de solution de solanine à 50 µM sont ajoutés. La solanine appartient à la même famille de molécule que la tomatine mais n'est présente qu'à l'échelle de traces dans les extraits de tomate. Elle sert d'étalon interne pour l'analyse en LC-MS.

- Analyse des polyphénols en HPLC

Cinquante microlitres d'extrait sont séparés en HPLC (modèle LC-20AD, shimadzu Corp., Kyoto, Japon) en utilisant une colonne RP-18 (4x250 mm, 5 μ m, merck, Darmstadt, Allemagne) précédée d'une précolonne (Lichrospher RP-18, 5 μ m, Merck). La phase mobile est de l'eau ultra pure contenant 0.1% d'acide formique (solvant A) et du méthanol contenant 0.1% d'acide formique (solvant B). Le gradient d'éluion, représenté en Figure 40, est élué à 0.5 ml.min⁻¹.

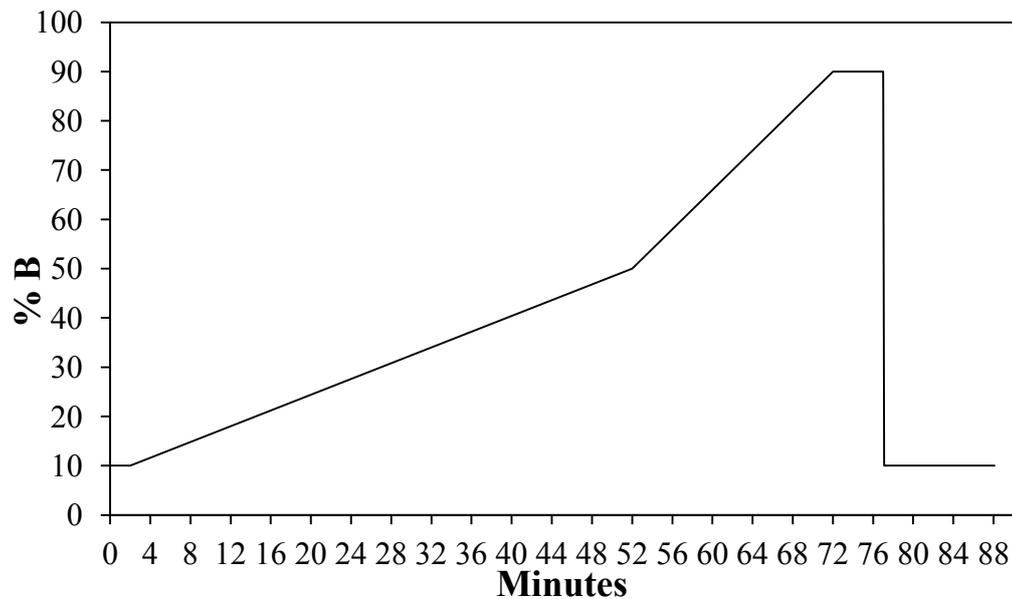


Figure 40: Représentation du gradient d'éluion de la méthode d'analyse en HPLC des polyphénols – durée : 88.1 min

Les principaux composés phénoliques étudiés (acide chlorogénique, rutine et kaempferol-rutinoside) sont correctement séparés (Figure 41). L'acide chlorogénique est élué à environ 30 min suivi par l'étalon interne, la taxifoline, élue à environ 45 min. Ce pic étalon nous permet de vérifier si l'extraction s'est bien déroulée. Ensuite, la rutine est élue à environ 55 min puis le kaempferol-rutinoside à 60 min.

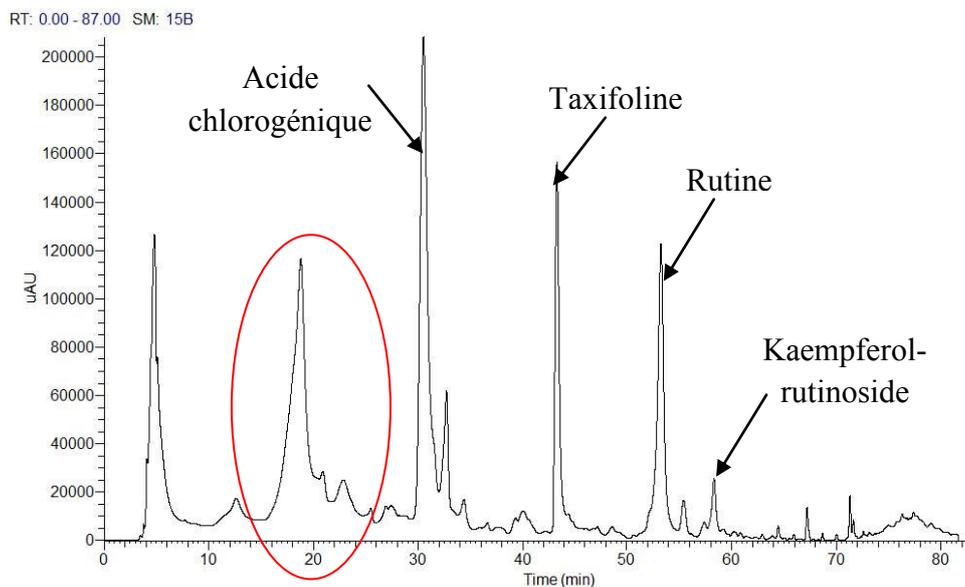


Figure 41: Chromatogramme d'une analyse HPLC de feuilles de tomate à la longueur d'onde 330 nm

La détection est réalisée par un détecteur à barrette de diode (200 – 400 nm) et la quantification des aires de pics se réfère à des gammes de concentrations connues d'étalon de rutine, d'acide chlorogénique et de kaempferol-rutinoside (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France).

Cette méthode permet de quantifier les principaux composés phénoliques présents dans les organes de plants de tomate. Néanmoins, pour l'expérimentation avec la bactérie *Pseudomonas*, nous avons adapté cette méthode pour séparer l'amas de pic élué entre la 15^{ème} et la 25^{ème} min (Figure 41 – amas entouré de rouge). Les analyses ont été faites en U-HPLC-MS (Shimadzu, Japon). Un microlitre d'extrait est séparé sur une colonne C18 Kinetex (100x2.1 mm, Phenomenex, USA). La phase mobile est identique à celle utilisée en HPLC. Le gradient d'élution (de 1 à 60% B en 6.8 min ; de 60 à 90% en 2.7 min ; 90% pendant 1 min ; 1% pendant 2 min) est élué à 0.3 ml.min⁻¹.

- Analyse du caffeoyl-putrescine en U-HPLC-MS des échantillons de l'expérimentation *Pseudomonas*

Le caffeoyl-putrescine, élué à 3.2 min, est quantifié en mesurant l'aire de pic à m/z 251 suivi en mode positif. La taxifoline (m/z 305 suivi en mode positif) est utilisée comme étalon interne. La quantification des aires de pics se réfère à des gammes de concentrations connues d'étalon de caffeoyl-putrescine (fourni par le Dr. Werck-Reichhart de l'IBMP de Strasbourg).

- Analyse de la tomatine en LC-MS

La tomatine est séparée et détectée en HPLC-MS (LTQ-MS, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) sur 2 μ l d'extrait, préalablement dilué 50 fois. Une solution de solanine, utilisée comme étalon interne est rajoutée (pour atteindre une concentration finale de 2 μ M dans l'extrait, Extrasynthèse). La séparation est réalisée avec une colonne C18 (150x2.1 mm, 5 μ m, Alltech Associates inc., USA). La phase mobile est identique à celle utilisé pour l'analyse des polyphénols et le gradient d'élution, présenté sur la Figure 41, est élué à 0.2 ml.min⁻¹.

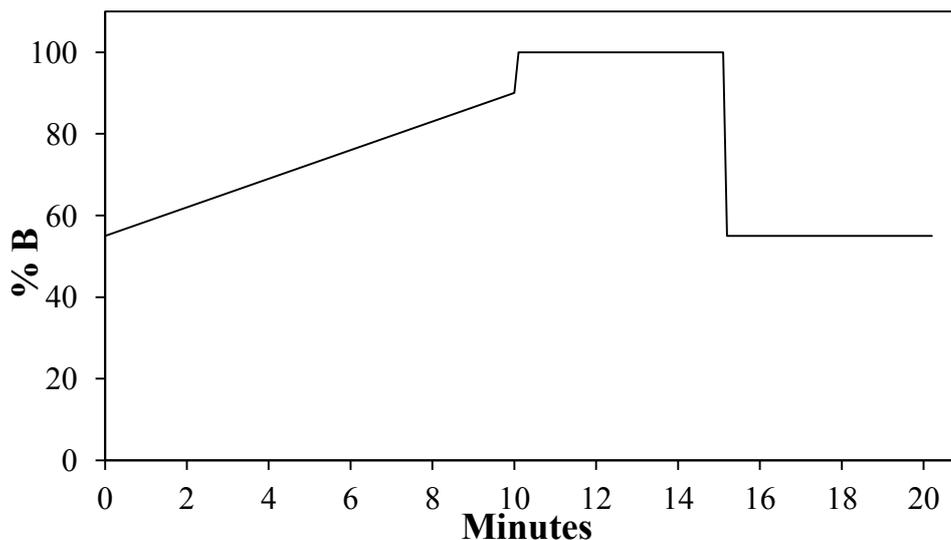


Figure 42: Représentation du gradient d'élution de la méthode d'analyse en HPLC-MS de la tomatine– durée : 20.2 min.

La tomatine est quantifiée en mesurant l'abondance de deux ions spécifiques détectés en mode positif. Le fragment de masse m/z 529 correspond à un ion doublement chargé de type $[\text{tomatine} + \text{H} + \text{Na}]^{2+}$, celui de m/z 578.5 correspond à l'ion $[\text{tomatine} + \text{galactose} + \text{H}]^+$ (Cataldi *et al.*, 2005). L'aire de pic à m/z 446 correspondant à l'étalon interne solanine suivi en ionisation positive, est également mesuré. Le ratio $[\text{aire}(529) + \text{aire}(578.5)]/\text{aire solanine}$ est établi. La quantification est obtenue en utilisant une gamme de tomatine de concentrations connues avec la solanine comme étalon interne.

3.4.d. Extraction et dosage de la lignine

La lignine est extraite et déterminée d'après la méthode à l'acetyl bromide de Morrison et Stewart (1995).

Cinquante mg de poudre lyophilisée sont extraits avec 1.5 ml d'éthanol 70%. Après agitation au vortex, le mélange est centrifugé (10000 g – 10 min) et le surnageant est éliminé. Sur le culot, 1.5 ml d'une solution chloroforme/méthanol (50/50) est ajouté. Après resuspension du culot, le mélange est centrifugé (10000 g – 10 min) et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 500 μl d'acétone. Après évaporation de l'acétone au SpeedVac[®], le culot est resuspendu dans 1.5 ml d'acétate de sodium 0.1 M pH 5 et le mélange est incubé à 80°C pendant 20 min. Après refroidissement des tubes, 35 μl d'azide de sodium (NaN_3) 0.01% et 35 μl d'amylase 50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ sont ajoutés et le mélange est agité au vortex. Il est ensuite incubé à 37°C avec agitation pendant une nuit. Après incubation des tubes à 100°C pendant 10 min et centrifugation (10000 g - 10 min), le surnageant est éliminé. Le culot est lavé avec 3x1.5 ml d'eau ultra-pure et resuspendu avec 500 μl d'acétone. Après évaporation de l'acétone au SpeedVac[®], le culot obtenu (contenant de la lignocellulose) est utilisé pour doser la lignine.

Un à 1.5 mg de poudre issu de ce culot sont pesés. Deux cent cinquante microlitres d'acétone sont ajoutés et évaporés au SpeedVac[®]. Cent microlitres d'une solution acetyl bromide/acide acétique glacial (25/75) sont ajoutés sur le culot. Le mélange est chauffé à 50°C pendant 3h en mélangeant toutes les 15 minutes durant la dernière heure. Après refroidissement, 400 μl de solution de NaOH 2 M et 70 μl de solution d'hydroxylamine hydrochloride 0.5 M sont ajoutés et le mélange est agité au vortex. L'extrait est complété à 2 ml avec de l'acide acétique.

La mesure d'absorbance se fait à 280 nm sur 200 μl de solution en microplaque 96 puits. La quantification est obtenue par une gamme de lignine (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) de concentration connues.

4. Analyses statistiques

J'ai réalisé des analyses de variance avec un script lm à l'aide du logiciel R (version 2.14.1). La significativité des effets est fixée à $p < 0.05$. Le test de corrélation entre variance et moyennes et les tests de normalité (Shapiro-Wilk), d'autocorrélation des résidus (Durbin-Watson test) et d'homoscédaticité (Breusch-Pagan test) permettent de s'assurer la distribution normale et l'homoscédaticité des données. Les données sont transformées en log ou en puissance, si les conditions de la normalité ne sont pas respectées.

Pour les analyses sur les niveaux d'expression de gènes (voir 3.4.a. du chapitre 2), le logiciel StepOne 2.1 nous renvoie en bilan les quantités relative (RQ) moyenne en pondérant les trois réplicats techniques et les réplicats biologiques de chaque traitement. Ces données sont relatives à un traitement de référence où le RQ est égal à 1. Pour obtenir la significativité des différences entre traitements, nous avons utilisé les RQ minimum et maximum pour $\alpha = 5\%$, 1% ou 0.1% , données par le logiciel. En comparant les RQ minimum et maximum des traitements, deux à deux, pour chaque valeur d' α , nous avons pu mettre en évidence des différences significatives entre certains traitements ($\alpha = 5\% < * < \alpha = 1\% < ** < \alpha = 0.1\% < ***$).

Les droites de régression sont obtenues en utilisant les coefficients de Pearson et en testant la normalité des résidus. Si le test de normalité n'est pas accepté, j'ai transformé les données en log.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Partie 1 : le ratio C/N des tissus : variable indicatrice du partage des ressources entre les deux métabolismes ?

Nous avons vu, dans la bibliographie, que le carbone et l'azote sont des éléments indispensables pour les plantes. En effet, le compromis entre métabolismes primaire et secondaire, conceptualisé par les différentes théories : GDBH, CNB... est conditionné par la disponibilité en ressources dont le carbone et l'azote. De nombreuses études sur la croissance des plantes utilisent ce ratio C/N pour diagnostiquer le statut de croissance des organes. Dans cette partie, nous voulons étendre son pouvoir indicateur au partage des ressources entre les deux métabolismes. En effet, les molécules qu'elles soient issues du métabolisme primaire ou secondaire sont principalement formées d'atome de C et de N ; ainsi, le ratio C/N devrait être intimement relié aux différentes concentrations en métabolites, et de façon différente selon la composition en carbone et azote de ces molécules. Pour faire varier le ratio C/N des tissus, nous avons utilisé deux concentrations atmosphériques en CO₂ et deux concentrations en azote de la solution. Afin de travailler dans des conditions réalistes sur le plan agronomique, nous avons créé une situation de limitation azotée (non carencée). Les conditions expérimentales ont été mesurées au long de la culture pour s'assurer que les disponibilités en azote et carbone soient les seuls paramètres mis en variation. Au cours de la culture, des paramètres, tels que l'élaboration de la croissance, les échanges gazeux foliaires, le ratio C/N, les concentrations en métabolites primaires (glucides simples, amidon) et secondaires (acide chlorogénique, rutine, tomatine...), ont été analysés pour caractériser l'état physiologique des plantes.

Cette partie fait l'objet d'une publication dans *Phytochemistry* (Annexe 2).

1. Matériel et méthodes (rappels)

Les résultats de l'expérimentation mise en place à l'INRA de Champenoux (54) sont présentés dans cette partie. Le dispositif expérimental est développé dans la partie 2.1 du chapitre 2. Dix jours après semis, les plantules de tomate sont placées dans deux serres mitoyennes. Je rappelle brièvement ici les traitements appliqués : facteur « CO₂ » dans une serre avec une concentration en CO₂ ambiante, l'autre enrichie en CO₂ (700 vpm) – facteur « azote » avec deux niveaux d'azote testés (HN : 7 mM et LN : 0.1 mM). Pour chaque niveau, l'azote est apporté soit par du nitrate seul (N_{nit}), soit par un mélange nitrate/ammonium (N_{mix}).

Les récoltes sont effectuées 27, 35 et 47 jours après semis (Tableau 5).

Pour chaque catégorie d'organe, les paramètres mesurés sont le ratio C/N, les concentrations en métabolites primaires : glucides simples (glucose + fructose) et amidon, les concentrations en métabolites secondaires carbonés : acide chlorogénique, rutine et kaempférol-rutinoside, un métabolite de fin de chaîne des phénylpropanoïdes : la lignine, et un métabolite secondaire carboné et azoté : la tomatine.

A la première récolte (27 JAS), les feuilles en développement et les feuilles développées sont regroupées.

Expérimentation	Facteurs		répétitions par traitement	Dates de récolte	organes récoltés
	facteur azote	facteur CO ₂			
Expérimentation ratio C/N	2 modalités : HN (7 mM) LN (0.1 mM)	2 modalités : - [CO ₂] ambiant - [CO ₂] enrichie (700 ppm)	3 plantes	3 Récoltes : 27, 35 et 47 jours après semis	Feuilles en développement Feuilles développées Tige Racines

Tableau 5 : Récapitulatif des facteurs appliqués, du nombre de répétition, des dates de récoltes et des organes récoltés lors de l'expérimentation à l'INRA de Champenoux

2. Contrôle des paramètres de culture

Pendant toute la durée de l'expérimentation, les conditions environnementales (telles que l'humidité relative, la température de l'air, ou le pH des solutions...) sont mesurées et certaines sont régulées (pH et concentration en nitrate des solutions, [CO₂] de la serre enrichie).

2.1. Conditions de l'environnement

Pour que les effets que nous avons observés soient imputables seulement aux variations de [CO₂], il fallait vérifier que les deux serres aient bien subi les mêmes contraintes du climat extérieur. Pour cela, la température et le rayonnement lumineux dans les deux serres mitoyennes sont mesurés (Figure 42). On observe que ces deux paramètres ont évolué de façon identique pour les deux serres au cours de la culture. La température moyenne journalière est restée relativement constante, oscillant entre 19.5 et 21.5°C.

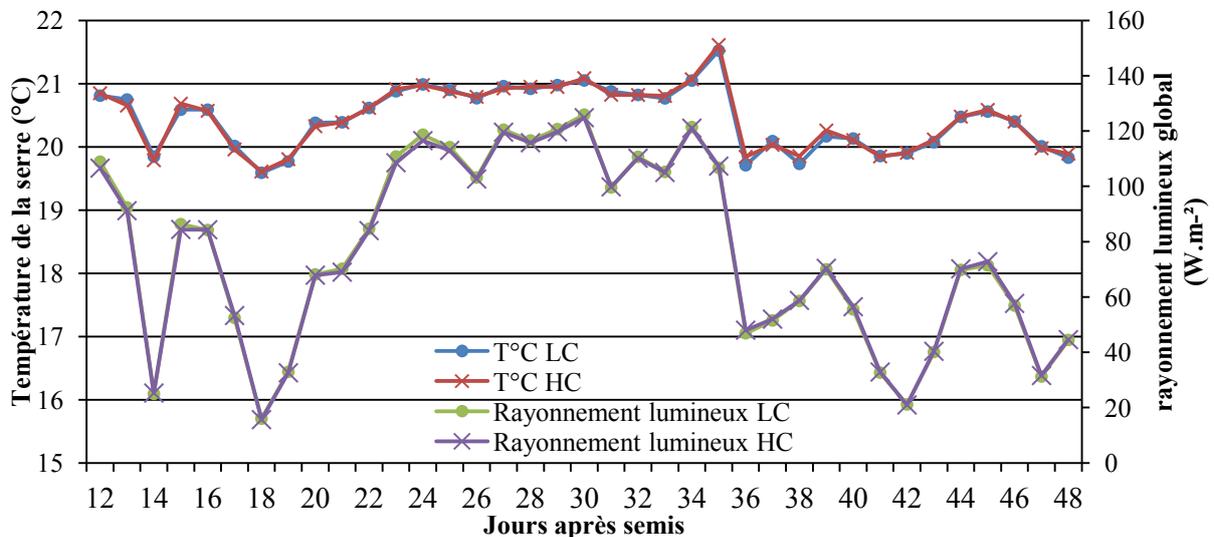


Figure 43 : Evolution de la température (°C) et du rayonnement lumineux (W.m⁻²) dans les deux serres – LC : serre avec [CO₂] ambiant – HC : serre avec [CO₂] enrichi

Le seul paramètre climatique variant entre les deux serres est donc la concentration en CO₂ de l'air. Il est contrôlé dans les deux serres et ajusté uniquement dans la serre enrichie durant la culture. On observe une valeur constante de [CO₂] dans les deux serres, à une valeur de 400 ppm dans la serre LC et de 700 ppm dans la serre HC (Figure 44).

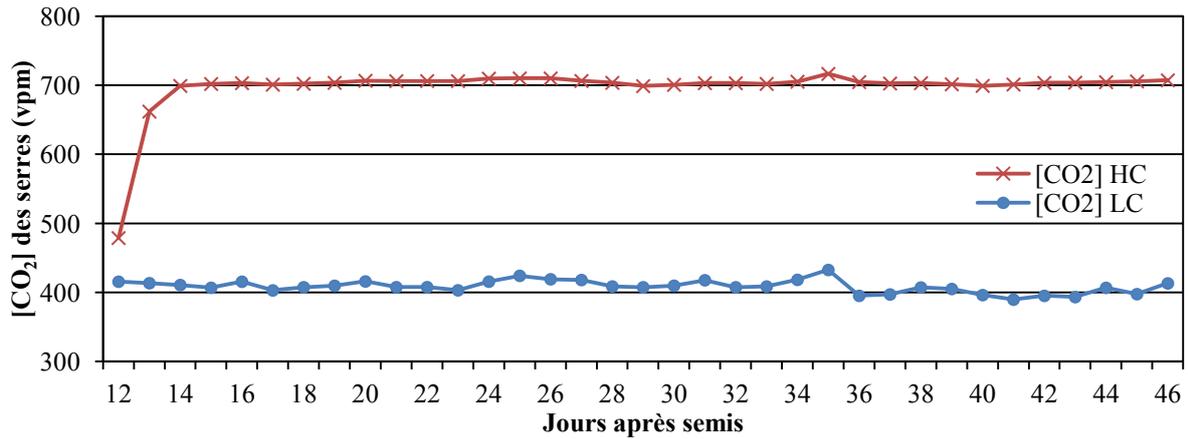


Figure 44 : Evolution de la concentration en CO₂ de l'atmosphère des deux serres.

2.2. Suivi et ajustements des solutions nutritives

Le pH et la concentration en nitrate de la solution sont mesurés tous les deux jours pendant la période du 6 au 30 avril, puis tous les jours jusqu'au 10 mai.

De ce fait, nous avons obtenu une courbe de pH des solutions oscillant entre 5 et 5.5 (Figure 45). La valeur cible est de 5 pour les solutions uniquement alimentées en N par du nitrate, car l'absorption du nitrate par les plantes augmente le pH. Alors que la valeur cible pour les solutions alimentées par un mélange nitrate/ammonium est de 5.5 car l'absorption de l'ammonium, au contraire, acidifie. Une solution de H₂SO₄ 1N ou de NaOH 1N est ajoutée pour réajuster le pH à la valeur cible. Le pH est régulé précisément et régulièrement pour qu'il soit considéré constant pendant la culture.

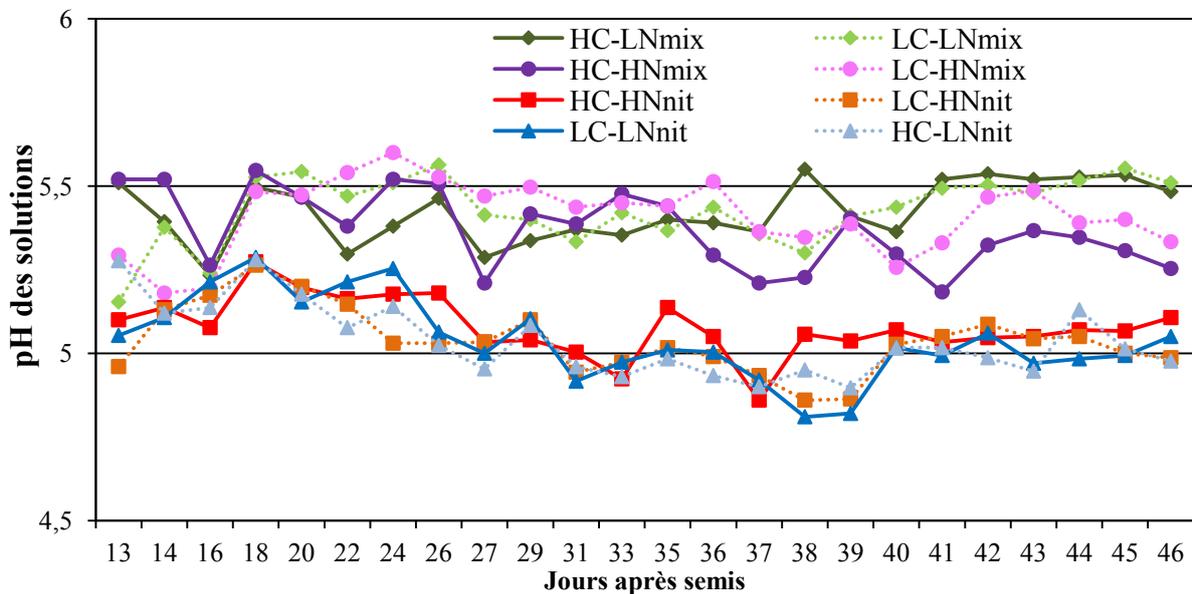


Figure 45 : Evolution du pH moyen des solutions au cours de la culture (de 13 JAS à 46 JAS) – HC : [CO₂] fort – LC : [CO₂] faible – HN : [N] fort – LN : [N] faible – mix : N=nitrate/ammonium – nit : N=nitrate – n=3

La concentration en nitrate des solutions est mesurée au cours de la culture et ajustée immédiatement après, notre but étant d'obtenir une concentration en nitrate la plus constante possible et discriminante entre les traitements. Nous observons que les concentrations en

nitrate dans les solutions sont stables pendant la culture (Figure 46). Pour les solutions HN (carré rouge et rond violet), le pourcentage d'écart avec la concentration consigne est faible (de -13% à 5%). Pour les solutions LN (losange bleu et triangle vert), les faibles concentrations cibles (bleu = 0.1 mM NO_3^- et vert = 0.07 mM NO_3^-) ont rendu la tâche de réajustement plus difficile. En effet, les plantes prélevaient très rapidement le peu d'azote disponible. Les concentrations en nitrate mesurées sont inférieures aux concentrations cibles de l'ordre de 50 à 60%. Néanmoins, ces concentrations ont été, immédiatement après mesure, réajustées à la concentration cible en injectant une solution de nitrate. De plus, avec le nombre croissant de réajustements au fur et à mesure de la culture, les concentrations en nitrate dans les solutions LN sont, elles-aussi, constantes.

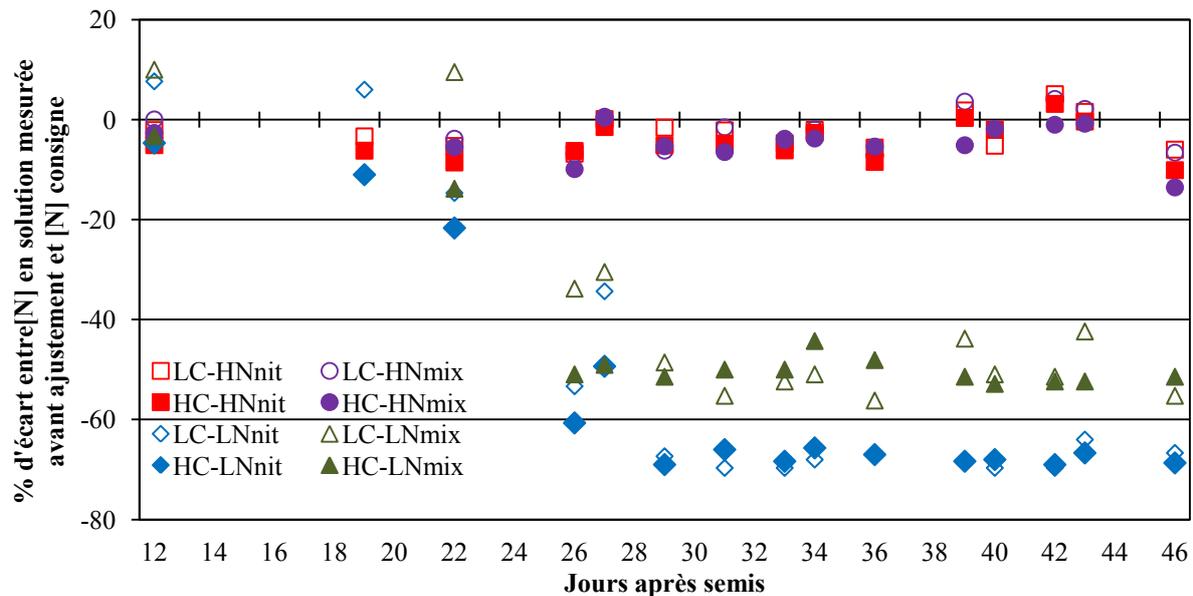


Figure 46: Evolution du % d'écart entre la concentration en nitrate dans les solutions mesurée avant ajustement et la concentration en nitrate consigne - HC : $[\text{CO}_2]$ fort – LC : $[\text{CO}_2]$ faible – HN : $[\text{N}]$ fort – LN : $[\text{N}]$ faible – mix : N=nitrate/ammonium – nit : N=nitrate – n=3

3. Effet des traitements CO_2 et N sur les paramètres de croissance

3.1. Production de biomasse totale et surface foliaire

Au cours de la culture, la production de biomasse sèche totale et la surface foliaire n'ont pas été affectées significativement par la forme d'azote (nitrate : N_{nit} ou nitrate/ammonium : N_{mix}). C'est pourquoi les formes d'azote sont regroupées dans les Figure 47 et Figure 48.

Les biomasses sèches sont multipliées par 30 entre la récolte 1 et la récolte 3 (Figure 47). Au stade végétatif (27 JAS), la biomasse sèche est augmentée significativement par une concentration en CO_2 élevée (effet CO_2 **) et par une concentration en N élevée dans la solution (effet N *). Au stade d'apparition des boutons floraux (35 JAS), l'effet de la quantité d'azote est plus marqué (effet N ***), augmentant la biomasse sèche sous HN. Par contre, l'effet CO_2 n'est plus significatif. Au stade floraison, l'interaction des effets CO_2 et N montre que l'enrichissement en CO_2 permet d'augmenter la biomasse sèche uniquement lorsque les plantes poussent sur une concentration pléthorique en N. La quantité d'azote dans les

solutions affecte la production de biomasse sèche à tous les temps de prélèvement. La masse sèche des plantes poussant sous HN est toujours plus élevée que celle des plantes poussant sous LN.

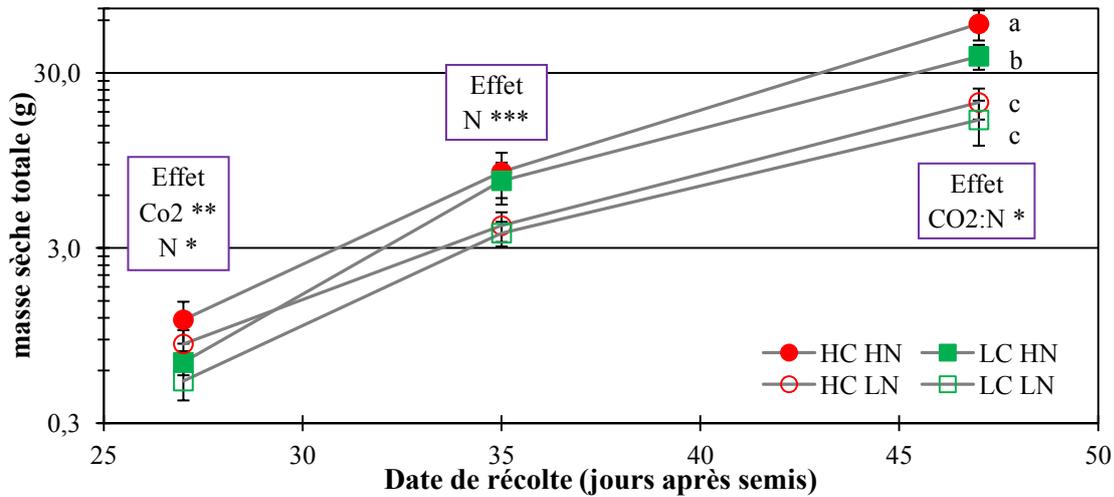


Figure 47 : Accumulation de biomasse sèche totale (g) en coordonnée logarithmique au cours de la culture – récolte à 27, 35 et 47 jours après semis - HC : [CO₂] fort – LC : [CO₂] faible – HN : [N] fort – LN : [N] faible – n=6

La surface foliaire totale suit la même évolution que la production de biomasse sèche totale. La surface est multipliée par 30 entre les récoltes 1 et 3 (Figure 48). Comme pour la biomasse sèche, l'effet de la quantité d'azote dans les solutions est significatif pour tous les temps de prélèvement (27 JAS : ** - 35 JAS : *** - 47 JAS : ***). La surface foliaire totale des plantes poussant sous HN est plus importante que celle des plantes poussant sous LN. L'effet CO₂ est seulement significatif à 27 jours après semis. L'enrichissement en CO₂ augmente la surface foliaire totale des plantes (effet CO₂ **).

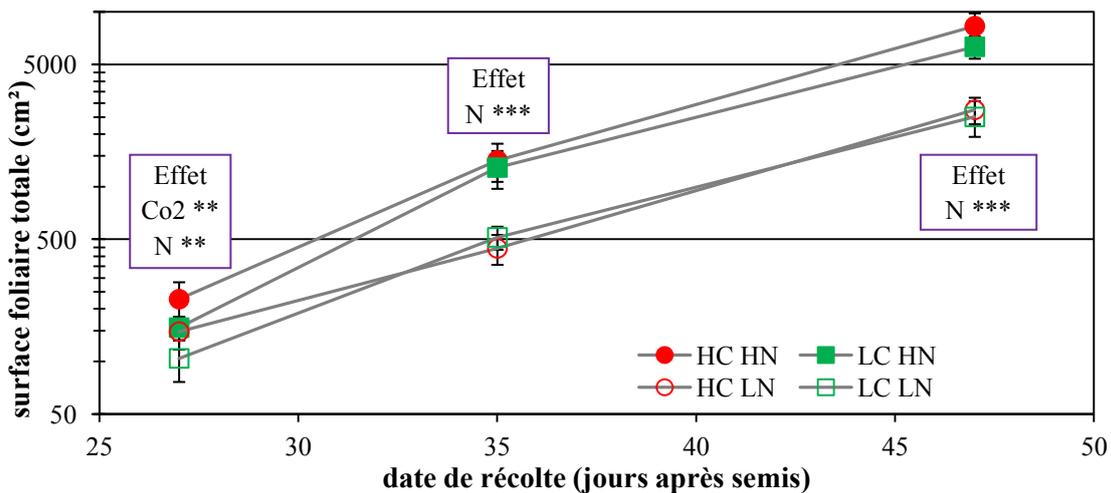


Figure 48: Evolution de la surface foliaire totale (cm² par plante) en coordonnée logarithmique au cours de la culture - récolte à 27, 35 et 47 jours après semis - HC : [CO₂] fort – LC : [CO₂] faible – HN : [N] fort – LN : [N] faible – n=6

3.2. Echanges gazeux foliaires

Le taux d'assimilation nette de CO₂ des feuilles jeunes, mesuré à 47 jours après semis, est affecté par la concentration en CO₂ (*) (Tableau 6). Les plantes poussant sous atmosphère enrichie en CO₂ ont un taux d'assimilation de CO₂ plus élevé. Pour les feuilles développées, on observe un effet azote (*) qui montre un taux d'assimilation plus élevé pour les plantes sous LN. De plus, les feuilles jeunes ont un taux d'assimilation de CO₂ plus fort (**). Le taux de transpiration des deux types de feuilles n'est pas affecté par les traitements.

			Taux d'assimilation nette de CO ₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)		Taux de transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	
			Feuilles jeunes	Feuilles développées	Feuilles jeunes	Feuilles développées
LC	HN	nit	4.7 (\pm 1.66)	4.0 (\pm 0.87)	2.5 (\pm 0.17)	2.4 (\pm 0.44)
		mix	5.0 (\pm 0.76)	3.6 (\pm 2.23)	2.5 (\pm 0.63)	2.1 (\pm 0.70)
	LN	nit	5.3 (\pm 0.70)	4.7 (\pm 1.01)	2.7 (\pm 0.50)	2.7 (\pm 0.60)
		mix	4.4 (\pm 0.61)	4.8 (\pm 1.72)	2.6 (\pm 0.29)	2.5 (\pm 0.29)
HC	HN	nit	8.7 (\pm 0.76)	2.8 (\pm 1.78)	2.3 (\pm 0.11)	2.1 (\pm 0.27)
		mix	8.9 (\pm 1.70)	6.2 (\pm 2.15)	2.3 (\pm 0.39)	2.3 (\pm 0.19)
	LN	nit	7.4 (\pm 0.59)	6.3 (\pm 0.75)	2.5 (\pm 0.20)	2.3 (\pm 0.10)
		mix	7.8 (\pm 1.70)	6.6 (\pm 0.06)	2.4 (\pm 0.06)	2.3 (\pm 0.10)
Effet significatif			Effet CO ₂ *	Effet azote *	ns	ns

Tableau 6 : Taux d'assimilation nette de CO₂ et taux de transpiration des feuilles jeunes et feuilles développées à 47 jours après semis – Les chiffres représentent : moyenne (\pm écart-type) – n=3

Ces informations nous confortent dans le choix des concentrations en azote des solutions. Les plantes ne sont pas en situation de carence, mais limitées en azote puisque la photosynthèse n'est pas affectée. Néanmoins, nous observons un effet positif de la faible disponibilité en azote (LN) sur le taux d'assimilation des feuilles développées, ce qui n'est pas cohérent d'un point de vue écophysologique. Cet effet (*) semble être relié à la présence d'une moyenne très faible de 3 répétitions (HC-HN nit : $2.8 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) par rapport aux autres plantes HN ($4.0 - 3.6 - 6.2 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) qui pourrait être une erreur de mesure.

3.3. Consommation d'eau et de nitrate

Le volume de solution de nitrate ajouté lors de chaque correction a été noté. La consommation journalière d'azote par plante peut être reliée à ce volume et au nombre de plantes présentes par support hydroponique.

L'ajout de solution de nitrate a débuté au 22^{ème} jour après semis (Figure 49). L'effet de la fertilisation azotée sur l'absorption du nitrate par les plantes est très visible. Les plantes sous HN absorbent plus de nitrate (+70 à 90%) que les plantes sous LN tout au long de la culture. L'effet de l'enrichissement en CO₂ est aussi significatif. Du JAS 22 au JAS 33, les quantités d'azote absorbées sont plus élevées en présence d'une concentration en CO₂ forte. Lorsque les plantes sont plus développées (JAS 34 au JAS 46), l'enrichissement en CO₂ augmente la consommation en azote seulement sous HN. Pour les plantes sous LN, la disponibilité en azote est donc bien un facteur limitant.

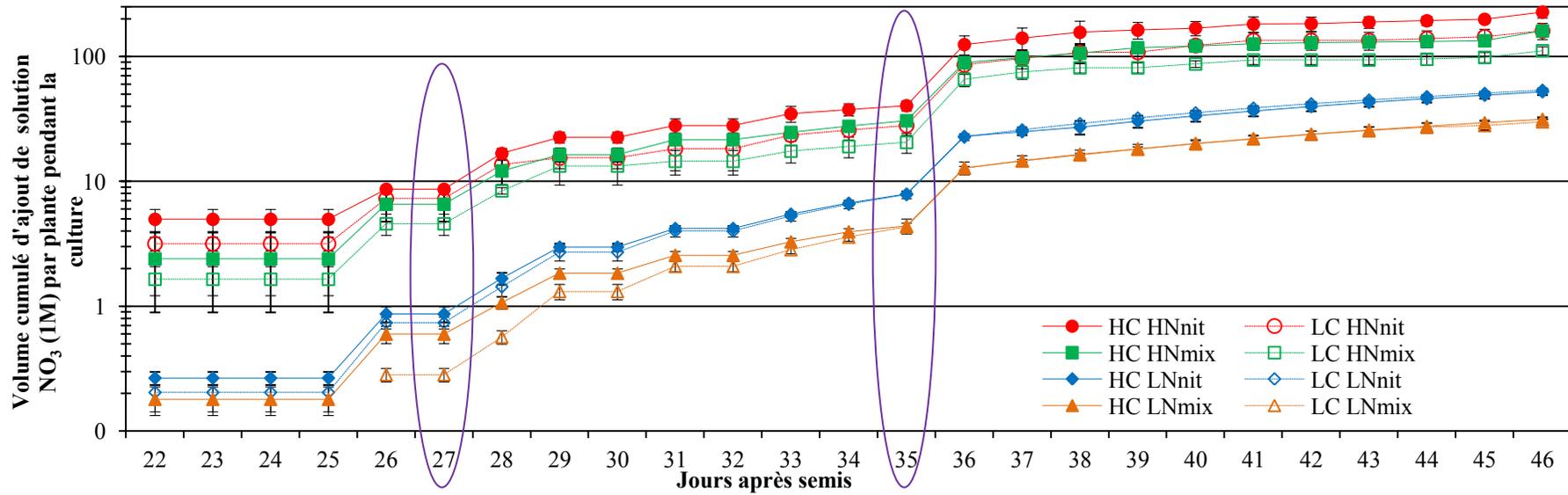


Figure 49 : Evolution du volume cumulé (ml) de solution de nitrate (1M) ajouté par plante durant la culture

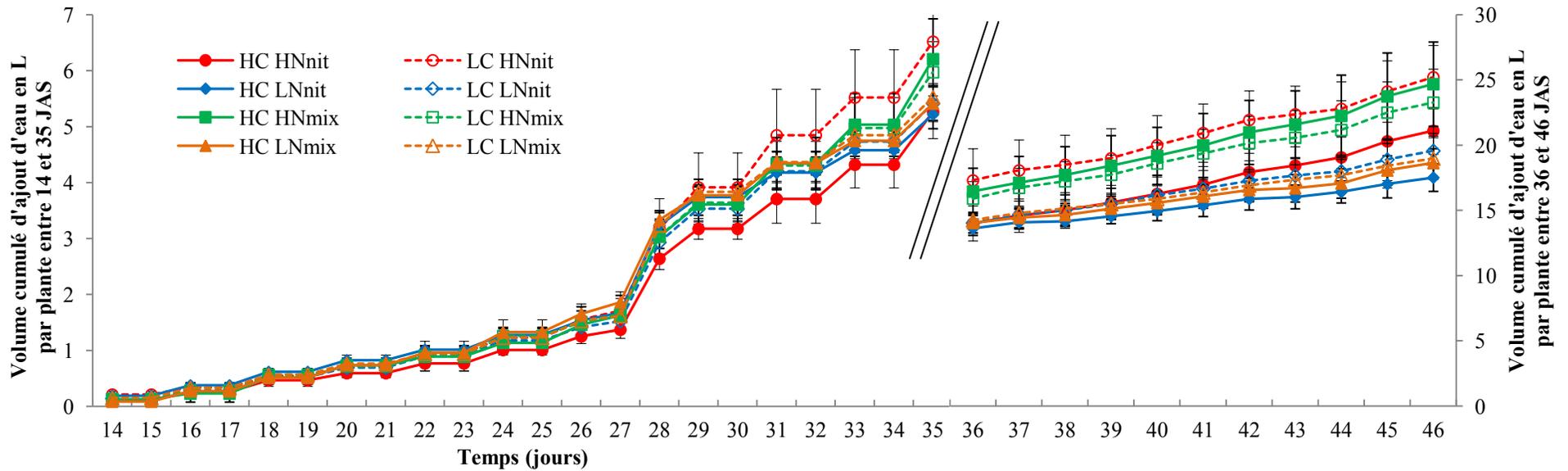


Figure 50 : Evolution du volume cumulé (L) d'eau ajouté par plante durant la culture

Au 27^{ième} jour après semis, l'effet CO₂ est significatif (*) et l'enrichissement en CO₂ augmente la consommation en azote. L'effet azote est aussi significatif (***) et la forte disponibilité en azote augmente l'absorption d'azote par les plantes. La présence d'ammonium diminue l'absorption d'azote seulement sous HN (*). Au 35^{ième} JAS, comme à la veille du 47^{ième} JAS, les quantités d'azote absorbées sont plus élevées en présence d'une forte concentration en azote dans la solution (***). L'enrichissement en CO₂ augmente l'absorption en azote seulement pour les plantes sous HN (interaction CO₂:N * 35 et ** 47 JAS). La présence d'ammonium diminue l'absorption en nitrate (***). La présence d'ammonium dans la solution nutritive permet à la plante de prélever soit du nitrate, soit de l'ammonium pour sa croissance. Cette présence diminue la consommation de nitrate.

Nous avons réajusté régulièrement le volume d'eau dans les cuves au cours de la culture. Ce volume peut être relié au volume d'eau prélevé par les plantes lors de leur croissance en supposant que le volume d'eau perdu par évaporation soit identique pour toutes les cuves.

L'ajout d'eau a commencé au 14^{ième} jour après semis (Figure 50). Du 14 JAS au 29 JAS, nous n'observons aucun effet de la disponibilité en azote et carbone sur le volume d'eau perdu. Ensuite, l'effet CO₂ se met en place. Ainsi, nous observons une plus faible quantité d'eau ajoutée pour les plantes poussant sous atmosphère enrichie en CO₂. Cependant l'écart entre HC et LC est assez faible (de 5.5 à 6.9%). L'effet azote apparaît à 36 JAS. Le volume d'eau ajouté est plus important pour les plantes poussant sous HN. Ici, l'écart est assez important (de 12.1 à 20.8%) et augmente avec l'âge des plantes.

4. Teneurs en C et N dans les différentes parties de la plante

4.1. Evolution de la concentration en azote ([N]) et en carbone ([C]) total des différents tissus à 27, 35 et 47 jours après semis

Pour les trois temps de prélèvement, la concentration en carbone total représente de 24 à 37 mmol.g⁻¹ de la matière sèche alors que l'azote total représente de 1.1 à 5.7 mmol.g⁻¹ de la matière sèche.

A 27 jours après semis, l'enrichissement en CO₂ diminue [N]_{total} (**) seulement dans les feuilles, alors que la fertilisation HN l'augmente (***) dans les feuilles, tiges et racines. Dans les trois organes étudiés, la présence d'ammonium (NH₄) dans la solution nutritive augmente [N]_{total} sous HN et la diminue sous LN (***). Concernant la concentration en carbone, les effets sont moins visibles et les écarts entre les traitements faibles. Dans les tiges, la fertilisation HN diminue [C]_{total} (**) mais l'écart entre les traitements est faible (0.5 mmol.g⁻¹ entre 26.2 à 26.7 mmol.g⁻¹) alors que l'écart de [N]_{total} entre HN et LN est de 1.6 mmol.g⁻¹ (de 2 à 3.6 mmol.g⁻¹). Dans les racines, la présence d'ammonium augmente [C]_{total} sous HN (** écart de 0.5) et n'affecte pas la concentration sous LN (Tableau 7.A).

			LC				HC			
			HN		LN		HN		LN	
			nit	mix	nit	mix	nit	mix	nit	mix
A. 27 JAS	[N]_{total} (mmol.g⁻¹ MS)	F	4.5 (±0.10)	4.8 (±0.04)	3.8 (±0.28)	2.9 (±0.62)	3.9 (±0.06)	4.3 (±0.01)	3.2 (±0.11)	2.5 (±0.13)
		T	3.4 (±0.08)	3.8 (±0.03)	2.2 (±0.25)	1.7 (±0.34)	3.4 (±0.07)	3.8 (±0.06)	2.3 (±0.16)	1.7 (±0.03)
		R	3.6 (±0.03)	4.0 (±0.06)	3.0 (±0.10)	2.8 (±0.29)	3.7 (±0.08)	4.0 (±0.11)	3.1 (±0.27)	2.7 (±0.11)
	[C]_{total} (mmol.g⁻¹ MS)	F	32.4 (±0.19)	32.7 (±0.13)	31.8 (±0.15)	33.0 (±0.11)	32.7 (±0.26)	33.0 (±0.08)	31.1 (±0.37)	33.3 (±0.32)
		T	25.6 (±0.04)	27.3 (±3.12)	26.1 (±0.47)	27.1 (±0.95)	26.0 (±0.06)	25.8 (±0.19)	26.3 (±0.44)	27.2 (±0.24)
		R	29.3 (±0.31)	29.9 (±0.29)	28.9 (±0.46)	28.8 (±0.11)	29.1 (±0.15)	29.5 (±0.23)	29.1 (±0.09)	28.6 (±0.33)
B. 35 JAS	[N]_{total} (mmol.g⁻¹ MS)	FED	5.1 (±0.06)	5.6 (±0.09)	3.5 (±0.17)	3.4 (±0.12)	5.0 (±0.04)	5.4 (±0.12)	3.2 (±0.21)	2.8 (±0.09)
		FD	4.0 (±0.02)	4.6 (±0.12)	2.6 (±0.14)	2.6 (±0.22)	3.4 (±0.12)	4.0 (±0.24)	2.1 (±0.21)	1.7 (±0.10)
		T	3.6 (±0.20)	4.1 (±0.19)	1.7 (±0.29)	1.4 (±0.13)	3.5 (±0.17)	3.8 (±0.16)	1.5 (±0.16)	1.2 (±0.07)
		R	3.4 (±0.17)	3.6 (±0.21)	2.2 (±0.34)	2.1 (±0.04)	3.6 (±0.14)	3.7 (±0.24)	2.2 (±0.14)	1.8 (±0.05)
	[C]_{total} (mmol.g⁻¹ MS)	FED	35.1 (±0.39)	35.6 (±0.45)	33.8 (±1.06)	33.9 (±0.18)	34.9 (±0.65)	35.7 (±0.75)	34.4 (±0.14)	34.3 (±0.54)
		FD	32.1 (±0.26)	32.6 (±0.81)	30.7 (±0.76)	30.8 (±0.42)	32.2 (±0.33)	33.6 (±0.57)	32.1 (±0.16)	31.7 (±0.46)
		T	25.1 (±0.62)	26.2 (±0.83)	28.3 (±0.47)	27.8 (±0.35)	27.1 (±0.27)	27.0 (±0.62)	28.6 (±0.48)	29.3 (±0.13)
		R	28.7 (±0.52)	29.7 (±0.56)	29.4 (±0.51)	28.8 (±0.40)	29.6 (±0.49)	30.5 (±0.56)	29.7 (±0.24)	30.1 (±0.48)
C. 47 JAS	[N]_{total} (mmol.g⁻¹ MS)	FED	4.7 (±0.07)	5.4 (±0.17)	3.7 (±0.05)	3.7 (±0.09)	4.3 (±0.23)	5.0 (±0.12)	3.3 (±0.24)	3.4 (±0.29)
		FD	3.9 (±0.10)	4.4 (±0.09)	3.0 (±0.14)	2.9 (±0.13)	3.0 (±0.17)	3.6 (±0.07)	2.5 (±0.22)	2.6 (±0.21)
		T	2.9 (±0.02)	3.3 (±0.11)	1.6 (±0.17)	1.5 (±0.12)	2.7 (±0.04)	3.2 (±0.06)	1.4 (±0.21)	1.4 (±0.17)
		R	2.9 (±0.15)	3.0 (±0.15)	1.8 (±0.07)	1.9 (±0.07)	2.9 (±0.10)	3.1 (±0.16)	1.6 (±0.27)	1.7 (±0.17)
	[C]_{total} (mmol.g⁻¹ MS)	FED	35.3 (±0.31)	36.3 (±0.68)	34.7 (±0.29)	34.5 (±0.37)	35.6 (±0.58)	36.2 (±0.40)	34.9 (±0.64)	34.9 (±0.33)
		FD	31.7 (±0.05)	32.4 (±0.29)	30.0 (±0.38)	29.3 (±0.63)	31.5 (±0.31)	32.3 (±0.35)	30.5 (±0.91)	30.7 (±0.29)
		T	26.5 (±0.14)	26.7 (±0.40)	27.8 (±0.30)	27.6 (±0.50)	26.9 (±0.25)	26.9 (±0.99)	28.6 (±0.41)	28.6 (±0.25)
		R	30.4 (±0.54)	31.0 (±1.09)	31.0 (±0.30)	30.7 (±0.33)	30.1 (±0.26)	31.3 (±0.39)	29.0 (±4.23)	31.1 (±0.61)

Tableau 7: Concentration en azote [N] et carbone [C] total en mmol.g⁻¹ MS pour les différents traitements à 27 (A.), 35 (B.) et 47 (C.) jours après semis – Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) – n=3 – F : Feuilles – FED : Feuilles En Développement – FD : Feuilles Développées – T : Tiges – R : Racines.

A 35 jours après semis, de façon identique au premier prélèvement, $[C]_{total}$ est moins affectée par les disponibilités en C et N que $[N]_{total}$. On observe un effet CO_2 uniquement dans les feuilles. Dans les feuilles en développement (FED), l'enrichissement en CO_2 diminue $[N]_{total}$ sous LN (***) mais pas sous HN. Dans les feuilles développées (FD), l'enrichissement en CO_2 diminue $[N]_{total}$ sous les deux niveaux de fertilisation (**). Comme à 27 JAS, la fertilisation HN augmente $[N]_{total}$ (***) dans les 4 organes étudiés. La présence de NH_4 affecte la concentration en N dans les feuilles et les tiges (**). Dans les FED et les tiges, la présence d'ammonium augmente $[N]_{total}$ sous HN et diminue $[N]_{total}$ sous LN. Pour les FD, la présence de NH_4 augmente $[N]_{total}$ sous HN mais n'affecte pas la concentration en azote sous LN ($[N]_{total}$ diminue mais l'effet est non significatif). Dans les racines, seule la disponibilité en azote affecte $[N]_{total}$. Dans les FED, la fertilisation HN augmente $[C]_{total}$ (**). Dans les FD, l'enrichissement en CO_2 augmente $[C]_{total}$ (* : écart de $0.85 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ MS}$). La présence de NH_4 augmente $[C]_{total}$ sous HN mais n'affecte pas la concentration en carbone sous LN dans les FD (**) et dans les racines (*) (Tableau 7.B).

A 47 jours après semis, l'enrichissement en CO_2 diminue $[N]_{total}$ (*) dans les feuilles et les tiges (Tableau 7.C) (écart de 0.4 mmol.g^{-1} pour les FED, 0.6 pour les FD et 0.1 pour les T). Pour les 4 organes étudiés, de façon identique aux deux précédents temps de prélèvement, la fertilisation HN augmente $[N]_{total}$ (**). Dans les feuilles et les tiges, la présence de NH_4 augmente $[N]_{total}$ sous la fertilisation HN mais pas quand les plantes poussent sous LN (**). Pour les racines, comme à 27 et 35 JAS, nous n'observons pas d'effet CO_2 . La présence d'ammonium augmente $[N]_{total}$ sous les deux niveaux de fertilisation (* - écart de 0.1). Dans les feuilles, la fertilisation HN augmente $[C]_{total}$ (***) alors que dans les tiges, le $[C]_{total}$ diminue sous HN (**). Dans les FD, l'enrichissement en CO_2 augmente $[C]_{total}$ sous LN mais pas sous HN (**). Dans les tiges, l'enrichissement en CO_2 diminue $[C]_{total}$ (*). La présence de NH_4 affecte $[C]_{total}$ seulement dans les FED. La présence de NH_4 augmente $[C]_{total}$ sous HN mais n'affecte pas la concentration en C sous LN (*). Dans les racines, la concentration en carbone n'est pas affectée par les différentes disponibilités en C et N (Tableau 7.C).

Pour les trois temps de prélèvements, la disponibilité en azote affecte la concentration en azote des tissus. Pour tous les organes, la fertilisation HN augmente $[N]_{total}$. L'enrichissement en CO_2 diminue essentiellement la concentration en azote dans les feuilles et dans une moindre mesure dans les tiges. Alors que nous n'observons pas d'effet de la présence d'ammonium sur la croissance, NH_4 affecte fortement $[N]_{total}$ qui augmente sous fertilisation HN et diminue sous LN. Les effets sur la concentration en carbone sont moins nets. L'enrichissement en CO_2 augmente $[C]_{total}$ des tissus uniquement dans les feuilles développées et les racines à 35 JAS (*), et à 47 JAS dans les feuilles développées sous LN (**). $[C]_{total}$ diminue même sous CO_2 enrichi dans les tiges à 47 JAS (*).

4.2. Etablissement du ratio C/N total : obtention d'une gamme de C/N par les différents traitements

Les ratios C/N totaux ont été calculés à partir des concentrations en carbone et azote des tissus exprimées en mmol.g^{-1} MS. A partir de ce paragraphe, nous développerons les résultats de la récolte à 35 jours après semis. En effet, à cette date, les concentrations en azote et carbone ont été fortement affectées par les traitements. Nous obtenons donc une gamme de ratio C/N total des tissus plus importante à 35 JAS (tous organes confondus : de 6.3 à 25 contre 6.7 à 16.9 à 27 JAS et 6.7 à 21 à 47 JAS). De plus, les effets des traitements sur les concentrations en métabolites se sont montrés plus nets à cette date. Néanmoins, les effets et relations observés aux deux autres récoltes sont identiques, quoique moins marqués.

La Figure 51 montre l'évolution du ratio C/N total en fonction de la concentration en azote total des différents organes étudiés. La gamme de ratio C/N total la plus large est observée dans les tiges. En effet, on observe un écart de 18.6 entre les deux ratios C/N extrêmes suivi par un écart de 11.5 dans les FD, de 8.1 dans les racines et 6.1 dans les FED. Pour tous les organes étudiés, le ratio C/N minimal est obtenu lorsque les plantes poussent sous LC – HN_{mix} et le ratio maximal sous HC- LN_{mix} .

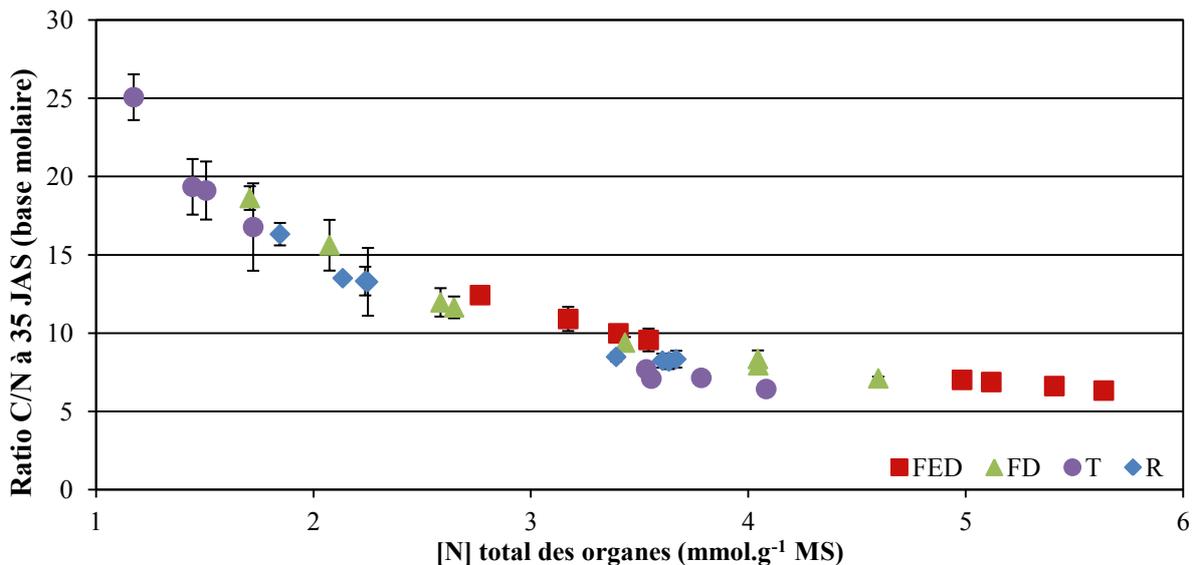


Figure 51: Ratio C/N total des des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) en fonction des concentrations en N total (mmol.g^{-1}) à 35 JAS – les barres verticales correspondent aux écarts-types – $n=3$

La disponibilité en azote affecte le ratio C/N de tous les organes. La fertilisation HN diminue le ratio C/N (***) (Figure 51). Dans les FED, l'enrichissement en CO_2 augmente le ratio C/N lorsque les plantes poussent sous fertilisation LN (***) - de 9.7 à 11.6) mais pas sous HN. Dans les FD, les tiges et les racines, l'enrichissement en CO_2 augmente le ratio C/N (FD ***, T *, R *). L'effet de l'ammonium en solution dépend de la fertilisation HN ou LN. En effet, dans les FED et les tiges, NH_4^+ augmente le ratio C/N du traitement LN (**). Dans les FD, NH_4^+ augmente ce ratio seulement sous LN et sous HC (*). L'ammonium n'affecte pas le ratio C/N des racines.

Les traitements C et N choisis affectent le ratio C/N. L'effet azote est plus fort que l'effet CO₂. De façon évidente, la fertilisation forte en azote diminue le ratio C/N alors que l'enrichissement en CO₂ l'augmente. La présence de NH₄ permet d'élargir encore la gamme, car sa présence dans la solution nutritive diminue les ratios C/N faibles alors qu'elle augmente les ratios C/N forts. Les ratios C/N extrêmes sont observés dans des plantes fertilisées par le mélange nitrate/ammonium.

4.3. Relation entre le ratio C/N et la production de biomasse

Nous avons montré, qu'à 35 JAS, la production de biomasse sèche totale est augmentée par une disponibilité en azote forte, au contraire du ratio C/N qui diminue. La Figure 52 montre que la production de biomasse sèche est inversement proportionnelle au ratio C/N dans tous les organes étudiés. La pente est la plus forte pour les FD (-0.24) alors qu'elle est proche de -0.1 dans les FED, tiges et racines.

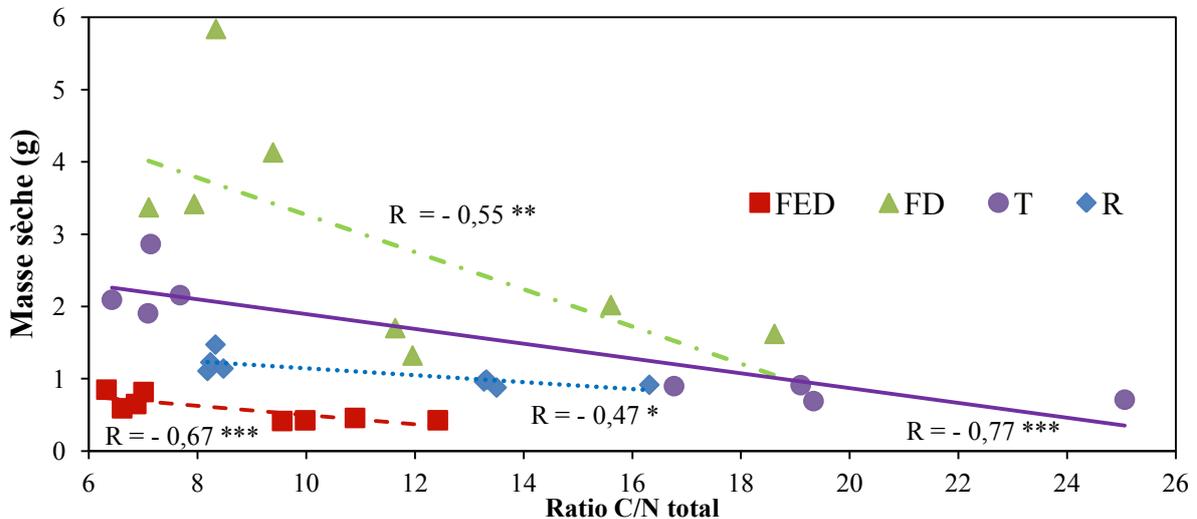


Figure 52: Masse sèche (g) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les droites de régressions sont représentées pour les FED par des tirets, les FD par des tirets-points, les tiges par une ligne continue et les racines par des points – Pour des raisons de clarté, les écarts-types verticaux et horizontaux ne sont pas matérialisés – Les droites de régression ne sont tracées que lorsque la régression est significative ($P < 0.05$) – R correspond au coefficient de Pearson – $n=3$ – $0.05 > ** > 0.01 > *** > 0.001 > ****$

5. Teneurs en glucides simples et amidon

Les concentrations en glucides simples (glucose + fructose) et en amidon ont été mesurées dans les tissus. Ces molécules ont été choisies pour représenter la voie du métabolisme primaire.

5.1. Teneurs en glucides en fonction du ratio C/N

Les glucides simples représentent de 1.5 à 7% de la masse sèche. On constate très peu de différences de teneurs entre les organes. Les concentrations dans les FD sont les plus élevées. Les concentrations en glucides dans les FD vont de 40 à 83 mg.g⁻¹ de MS alors que pour les

racines ou les FED, les concentrations vont de 12 à 30 mg.g⁻¹ de MS. Les concentrations dans les tiges sont intermédiaires puisqu'elles sont comprises entre 20 à 60 mg.g⁻¹ de MS.

La concentration en glucides simples est positivement corrélée (***) au ratio C/N des FED, des tiges et des racines. La concentration en glucides augmente de façon identique (pente positive : 2.6 mg.g⁻¹ MS par unité de ratio C/N) dans les FED et les racines alors que dans les tiges, elle augmente plus faiblement (pente : 1.2 mg.g⁻¹ MS par unité de ratio C/N). La situation des FD est différente, puisque la concentration en glucides est insensible au ratio C/N (Figure 53).

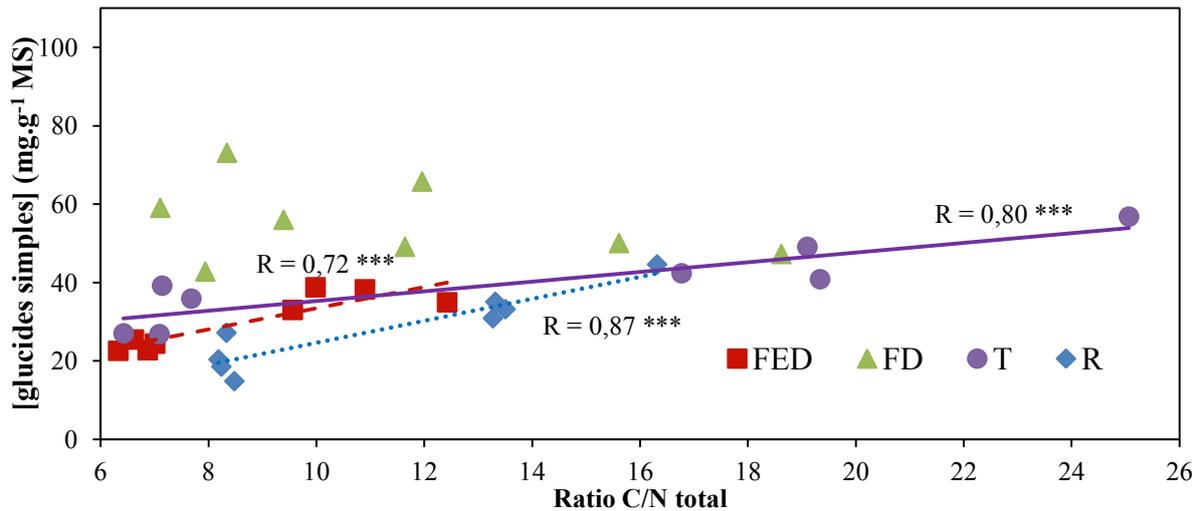


Figure 53: Concentrations en glucides simples (glucose + fructose) (mg.g⁻¹ MS) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à celles de la Figure 52 – n=3

5.2. Teneurs en amidon en fonction du ratio C/N

Dans les feuilles récoltées en fin de nuit, l'amidon représente en moyenne 2.3 à 4.2% de masse sèche alors que dans les tiges et racines, il représente seulement de 0.1 à 0.7% de masse sèche (Figure 54).

La concentration en amidon est corrélée positivement (***) au ratio C/N, dans tous les tissus étudiés. La concentration dans les feuilles est la plus sensible, la pente positive étant de 7.8 et 8.4 mg.g⁻¹ MS par unité de ratio C/N respectivement dans les FED et FD contre 0.7 et 0.1 respectivement, dans les tiges et les racines.

Dans les tiges, les concentrations en amidon et glucides répondent au ratio C/N de façon quasiment identique (pente positive de 0.7 et 1.2 mg.g⁻¹ MS par unité de ratio C/N respectivement). Dans les feuilles, l'amidon répond plus fortement au ratio C/N alors que dans les racines, les glucides simples sont plus sensibles.

Dans les tiges et racines, les glucides simples sont toujours plus concentrés que l'amidon (tiges : de 30 à 60 mg.g⁻¹ MS de glucides et de 2 à 20 mg.g⁻¹ MS d'amidon – racines : de 12 à 47 mg.g⁻¹ MS de glucides et de 0.1 à 1.6 mg.g⁻¹ MS d'amidon). Dans les feuilles, la concentration en amidon est plus faible seulement dans le cas de faible ratio C/N (dans les

FED, [glucides] minimum : 19 – [amidon] minimum : 4 – Dans les FD, [glucides] minimum : 40 – [amidon] minimum : 6). Par contre, lorsque le ratio C/N augmente, les concentrations en amidon deviennent très élevées (FED : 73 et FD : 116 mg.g⁻¹ MS).

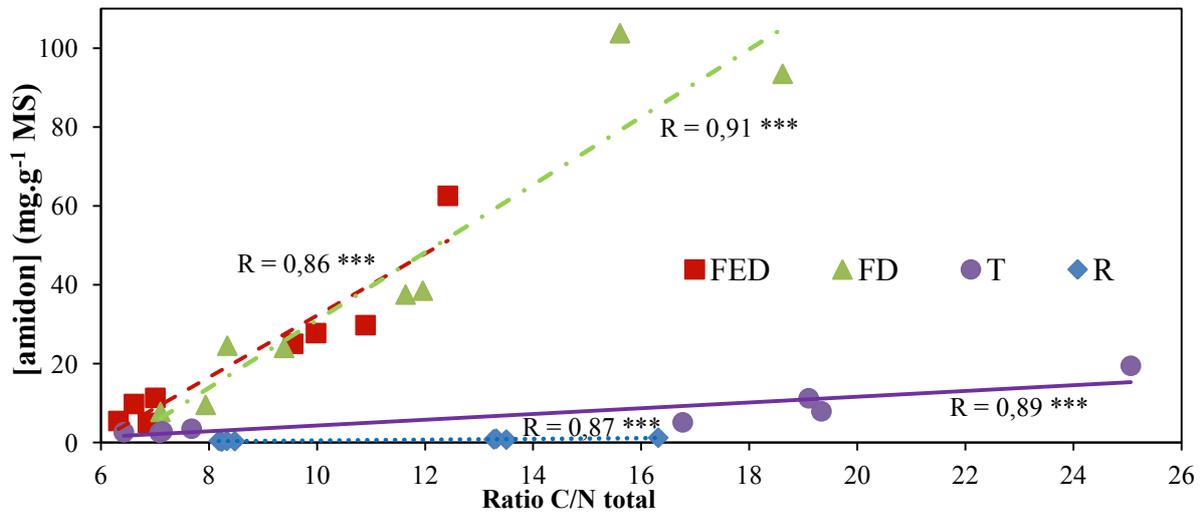


Figure 54: Concentrations en amidon (mg.g⁻¹ MS) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à celles de la Figure 52 – n=3

6. Teneurs en métabolites de défense en fonction du ratio C/N total

6.1. Principaux polyphénols

Les trois principaux polyphénols que nous analysons sont : l'acide chlorogénique, la rutine et le kaempferol-rutinoside. Tandis que l'acide chlorogénique est observé dans tous les organes étudiés, la rutine n'est pas détectée dans les racines et le kaempferol-rutinoside est détecté ni dans les tiges, ni dans les racines (Figure 55).

Les FED se distinguent des autres organes étudiés, par des concentrations plus élevées en acide chlorogénique (de 3 à 4.7 fois), en rutine (de 5 à 8 fois) et en kaempferol-rutinoside (5 fois). Viennent ensuite les FD, puis les tiges et enfin les racines qui présentent les plus faibles concentrations en ces 3 molécules.

Dans tous les organes, la concentration de ces métabolites est corrélée positivement au ratio C/N. Les FED se distinguent encore par des réponses fortes. Les pentes des droites vont de 0.08 à 0.94 dans les FED alors qu'elles ne dépassent pas 0.12 dans les FD. D'autre part dans les FED, la rutine répond à ce ratio plus fortement que l'acide chlorogénique et le kaempferol-rutinoside (pente de 0.94 ** contre 0.41 *** et 0.08 *** respectivement). Dans les FD, c'est l'acide chlorogénique qui réagit le plus fortement au ratio C/N avec une pente de 0.12 (***) contre 0.07 (***) et 0.009 (***) pour la rutine et le kaempferol-rutinoside respectivement. Dans les tiges, l'acide chlorogénique et la rutine répondent de façon similaire (pente de 0.03 à 0.04 ***). La concentration en acide chlorogénique est plus sensible aux variations du ratio C/N dans les racines, la pente de la régression étant de 0.1 mg.g⁻¹ MS par unité de ratio.

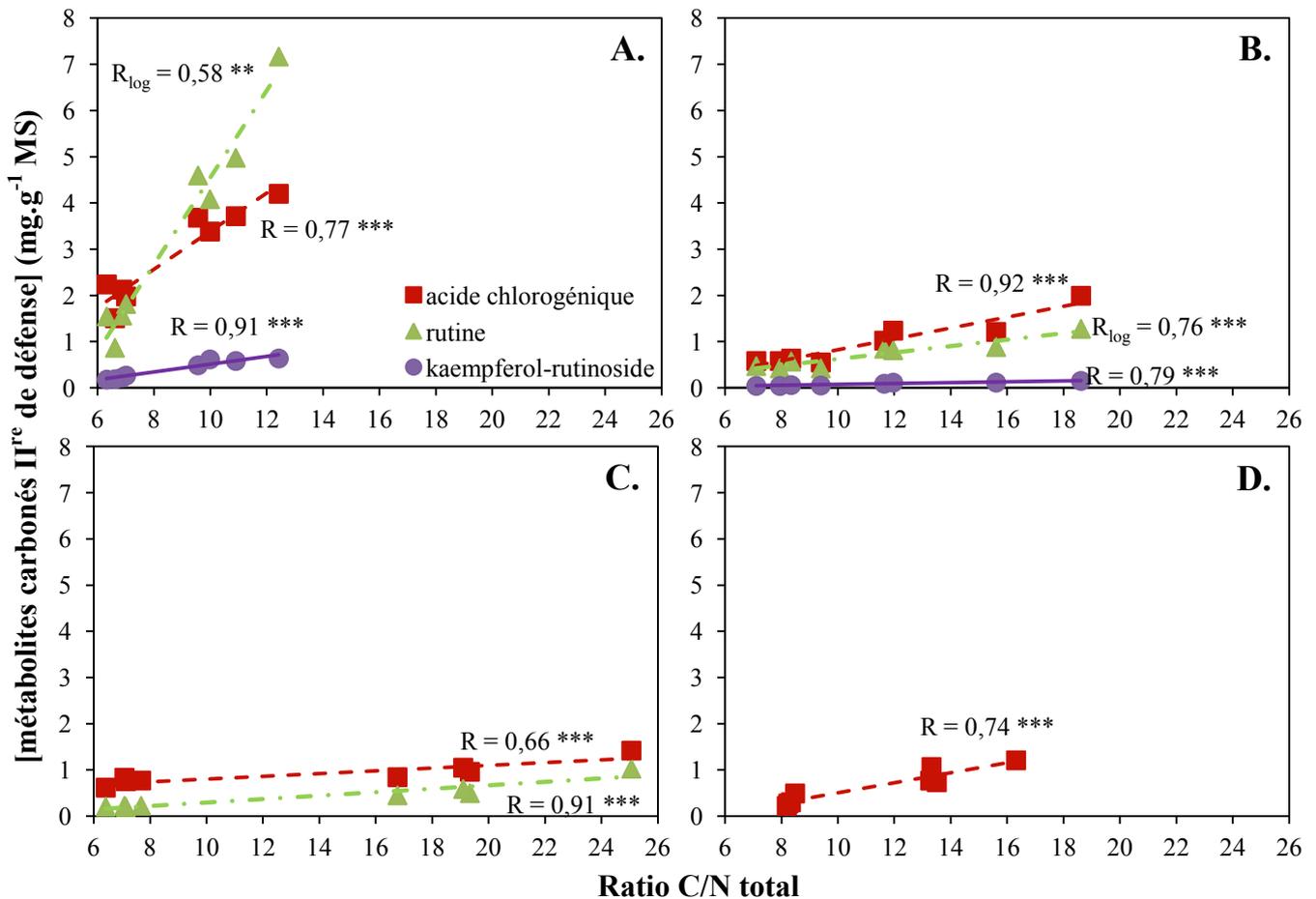


Figure 55 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en acide chlorogénique (■), rutine (▲) et kaempferol-rutinoside (●) en fonction du ratio C/N total dans les FED (A.), les FD (B.), les tiges (C.) et les racines (D.) – Les droites de régressions sont représentées pour l’acide chlorogénique par des tirets, la rutine par des tirets-points, le kaempferol-rutinoside par une ligne continue – Pour des raisons de clarté, les écarts-types verticaux et horizontaux ne sont pas matérialisés – Les droites de régression ne sont tracées que lorsque la régression est significative (P < 0.05) – R correspond au coefficient de Pearson – R_{log} correspond au coefficient de Pearson avec les valeurs transformées en log – n=3 – 0.05 > ‘*’ > 0.01 > ‘***’ > 0.001 > ‘****’

6.2. Cas d’un glycoalcaloïde : la tomatine

La tomatine contient du C et du N, contrairement aux métabolites précédents, exclusivement carbonés. Dans les organes récoltés, la concentration en tomatine est plus élevée que celle des autres métabolites de défense étudiés. Par exemple dans les FED, la concentration moyenne en tomatine est respectivement 2.8, 2.4 et 20.3 fois supérieure aux concentrations en acide chlorogénique, rutine et kaempferol-rutinoside (Figure 55 et Figure 56). Contrairement à la rutine et au kaempferol-rutinoside, la tomatine est détectée dans tous les organes étudiés. Sa concentration est plus élevée dans les FED (de 4.4 à 13.2 mg.g⁻¹ de MS), suivie des racines (de 3.9 à 7.9 mg.g⁻¹ de MS) puis des tiges et FD qui sont similaires et les moins concentrés (de 0.9 à 3 mg.g⁻¹ de MS).

Dans tous les organes, la concentration en tomatine est corrélée positivement à leur ratio C/N. La réponse est plus forte dans les FED (pente de 0.9) suivie des racines (pente de 0.3) et des tiges (0.13) et des FD (pente de 0.09). Dans les FED, la réponse est similaire à celle de la rutine (pentes de 0.92 et 0.94, respectivement). Dans les autres organes, la tomatine réagit

plus fortement que les autres métabolites de défense (par exemple, dans les tiges, pentes de 0.13 pour la tomatine contre 0.03 et 0.04 respectivement pour l'acide chlorogénique et la rutine).

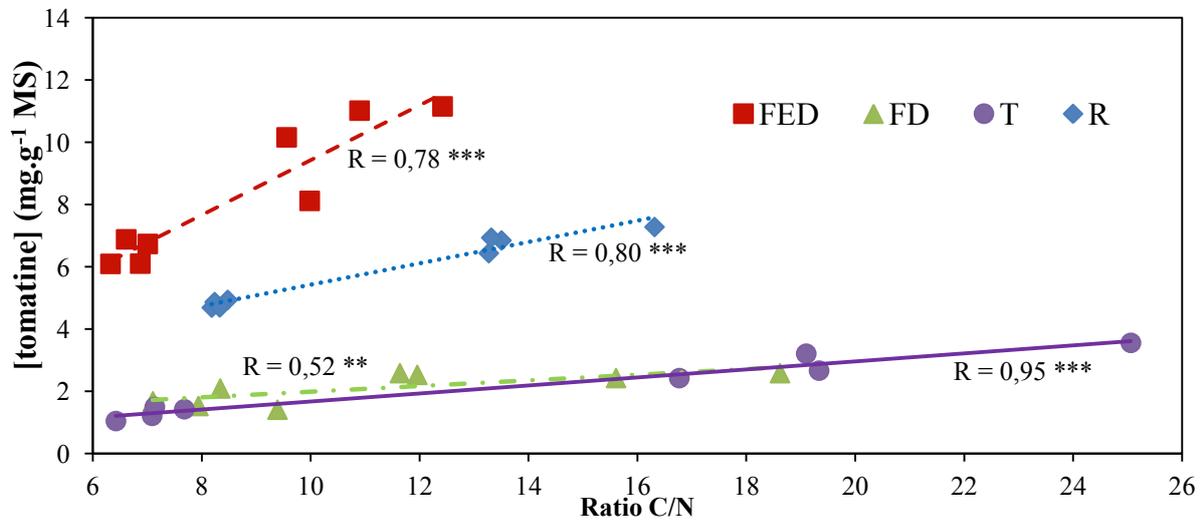


Figure 56 : Concentrations en tomatine ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à celles de la Figure 52 – $n=3$

7. Teneurs en lignine en fonction du ratio C/N

La lignine montre dans tous les organes étudiés une concentration qui varie de 1 à 10% de la matière sèche (Figure 57). Ces valeurs sont similaires à celles des métabolites primaires tels que les glucides simples ou l'amidon. La lignine est plus concentrée dans les tissus que les métabolites de défense étudiés plus haut (<1% de matière sèche). Les racines en contiennent la plus grande teneur (de 68 à 150 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) suivi des tiges, des FED (respectivement de 37 à 99 et de 39 à 115 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) et des FD (de 16 à 70 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS).

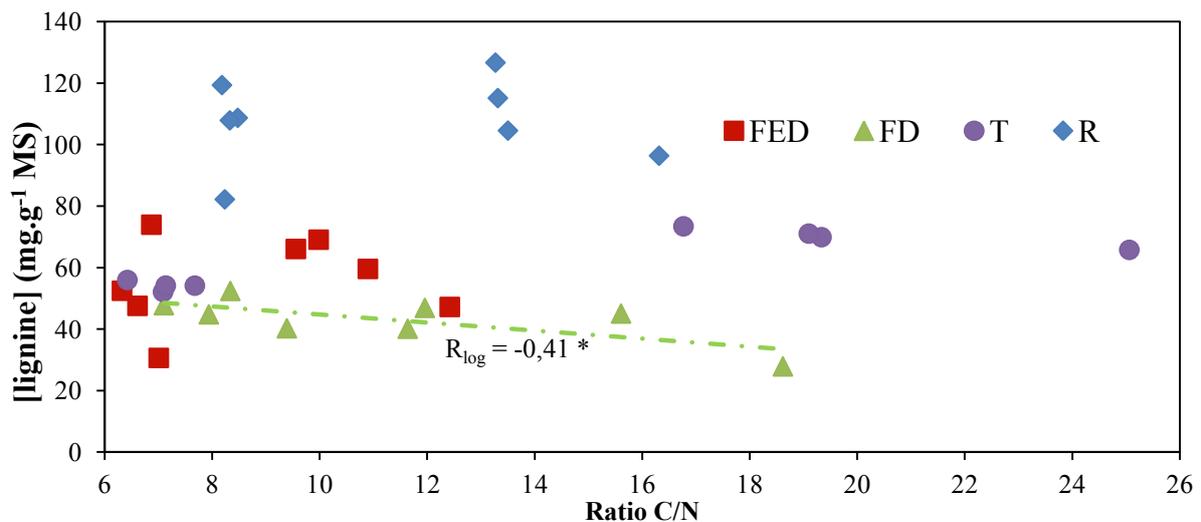


Figure 57 : Concentrations en lignine ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à celles de la Figure 52 – $n=3$

La concentration en lignine n'est pas corrélée significativement au ratio C/N total des tissus sauf dans les FD où la relation est faible et négative (*).

Les feuilles en développement possèdent les plus fortes concentrations en principaux polyphénols et en tomatine. Dans tous les organes étudiés, les concentrations en acide chlorogénique, rutine et kaempferol-rutinoside montrent une corrélation positive avec le ratio C/N. La tomatine, un glycoalcaloïde, suit la même évolution que les polyphénols. La lignine est beaucoup plus concentrée que les composés de défense étudiés, dans tous les organes. Ces concentrations avoisinent celle des composés primaires (glucides simples, amidon). De plus, elle n'est pas affectée par les variations du ratio C/N total.

8. Relation entre les teneurs en métabolites et les ratios C/N des structures et des ressources

8.1. Trois ratios C/N différents : ratio C/N total, des structures et des ressources

Dans les parties précédentes, le ratio C/N a été calculé d'après les concentrations totales en azote et carbone des tissus. Or, ces ensembles regroupent des molécules issues de « pools » assez bien identifiés, comme par exemple les ressources et les structures. Il est donc pertinent de chercher à caractériser les corrélations présentes entre les concentrations en métabolites et le ratio C/N calculé selon ces différents pools. Le ratio C/N des ressources (C/N_r) est calculé en divisant la concentration en atomes de carbone présents dans les glucides non structuraux (limités ici à l'amidon et aux glucides simples) par la concentration en atomes d'azote contenus dans les ions nitrate et ammonium libres des tissus. Le C/N des structures (C/N_s) est calculé selon cette formule : (concentration en carbone total – concentration en atome de carbone dans les glucides non structuraux) / (concentration en azote total – concentration en atome d'azote dans les ions nitrate et ammonium).

Dans tous les organes et pour tous les traitements, le ratio C/N des structures est similaire au ratio C/N total (Tableau 8). Par exemple, dans les FED, la gamme de ratio C/N total va de 6.3 à 12.4 et celle du ratio C/N des structures va de 6.4 à 11.3.

Ce n'est pas le cas du ratio C/N des ressources. En effet, la gamme de ratio C/N des ressources s'étire de 0.5 (minimum des racines) à 300 (maximum des FD). Dans les FED, alors que la gamme du ratio C/N total variait d'un facteur 5, celle du ratio C/N_r varie d'un facteur 26. La gamme de ratio C/N des ressources la plus large se retrouve dans les tiges (x 84 : de 0.7 à 59), comme pour le ratio C/N total. Dans tous les organes, le ratio maximum est atteint pour le traitement HC LN_{mix}, comme pour le ratio C/N total. Par contre, le ratio minimum est atteint pour le traitement LC HN_{nit}, alors que c'était pour le traitement LC HN_{mix} pour le ratio C/N total.

		LC				HC			
		HN		LN		HN		LN	
		nit	mix	nit	mix	nit	mix	nit	mix
C/N total	FED	6.9 (±0.11)	6.3 (±0.17)	9.6 (±0.73)	10.0 (±0.34)	7.0 (±0.19)	6.6 (±0.00)	10.9 (±0.77)	12.4 (±0.28)
	FD	7.9 (±0.06)	7.1 (±0.11)	11.6 (±0.69)	12.0 (±0.91)	9.4 (±0.35)	8.3 (±0.55)	15.6 (±1.62)	18.6 (±0.76)
	T	7.1 (±0.32)	6.4 (±0.35)	16.8 (±2.79)	19.3 (±1.78)	7.7 (±0.42)	7.1 (±0.13)	19.1 (±1.85)	25.1 (±1.46)
	R	8.5 (±0.28)	8.2 (±0.48)	13.3 (±2.16)	13.5 (±0.11)	8.2 (±0.45)	8.3 (±0.54)	13.3 (±0.92)	16.3 (±0.72)
C/N_s (structures)	FED	6.9 (±0.05)	6.4 (±0.13)	9.2 (±0.54)	9.4 (±0.35)	7.1 (±0.03)	6.6 (±0.05)	10.3 (±0.75)	11.3 (±0.58)
	FD	8.1 (±0.03)	7.2 (±0.11)	10.7 (±0.36)	10.7 (±0.81)	9.4 (±0.18)	8.0 (±0.64)	13.1 (±1.52)	15.8 (±0.59)
	T	11.6(±1.04)	9.5 (±0.52)	18.3 (±1.52)	19.7 (±1.12)	11.5 (±0.42)	9.8 (±0.81)	19.4 (±1.09)	23.7 (±1.33)
	R	11.9 (±0.80)	10.2 (±0.77)	13.8 (±2.02)	13.7 (±0.23)	11.3 (±0.83)	10.2 (±0.63)	13.7 (±0.91)	16.2 (±0.96)
C/N_r (ressources)	FED	5.0 (±1.49)	5.2 (±1.30)	37.8 (±22.85)	88.5 (±68.78)	5.4 (±2.45)	6.7 (±1.51)	43.3 (±6.99)	129.8 (±59.12)
	FD	6.3 (±1.03)	6.4 (±0.45)	74.0 (±45.08)	147.4 (±16.61)	10.0 (±3.46)	14.6 (±2.72)	169.4 (±14.74)	305.1 (±40.17)
	T	0.7 (±0.12)	0.7 (±0.16)	8.2 (±4.47)	15.9 (±8.06)	1.0 (±0.14)	1.2 (±0.34)	17.4 (±9.74)	59.3 (±9.27)
	R	0.5 (±0.06)	0.9 (±0.27)	7.5 (±3.71)	11.2 (±4.26)	0.6 (±0.05)	1.2 (±0.17)	7.6 (±0.70)	20.4 (±7.17)

Tableau 8: Ratios C/N totale, des structures (C/N_s) et des ressources (C/N_r) pour les différents traitements à 35 jours après semis – Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) – n=3 – F : Feuilles – FED : Feuilles En Développement – FD : Feuilles développées – T : Tiges – R : Racines.

		Amidon	Glucides simples	Acide chlorogénique	Rutine	Kaempferol-rutinoside	Tomatine	Lignine
FED	C/N total	0.86 ***	0.72 ***	0.77 ***	0.58 ** ⁽²⁾	0.91 ***	0.78 ***	ns
	C/N_s	0.90 *** ⁽²⁾	0.70 ***	0.76 ***	0.84 ***	0.90 ***	0.78 ***	ns
FD	C/N total	0.91 ***	ns	0.92 ***	0.76 *** ⁽²⁾	0.79 ***	0.52 **	-0.41 * ⁽²⁾
	C/N_s	0.88 ***	ns	0.91 ***	0.73 ***	0.77 ***	0.48 *	-0.44 * ⁽²⁾
T	C/N total	0.89 ***	0.80 ***	0.66 ***	0.91 ***	/	0.95 ***	ns
	C/N_s	0.87 ***	0.76 ***	0.65 ***	0.89 ***	/	0.95 ***	ns
R	C/N total	0.87 ***	0.87 ***	0.74 ***	/	/	0.80 ***	ns
	C/N_s	0.83 ***	0.75 ***	0.67 ***	/	/	0.69 ***	ns

Tableau 9: Matrice de corrélation entre les ratios C/N total et des structures (C/N_s) et la concentration des différents métabolites étudiés dans les quatre organes à 35 JAS – les chiffres correspondent au R de Pearson – (2) : variables transformées en log - 0.05 > '' > 0.01 > '***' > 0.001 > '****'**

8.2. Corrélations entre les teneurs en métabolites et les ratios C/N des structures et des ressources

Les valeurs du ratio C/N_s étant similaires à celles du ratio C/N total, on retrouve les mêmes corrélations avec les concentrations des différents métabolites étudiés (Tableau 9). La concentration en glucides simples dans les FD n'est pas non plus corrélée au ratio C/N_s. La concentration en lignine n'est pas corrélée au ratio C/N_s sauf dans les FD où on observe une faible corrélation négative, similaire à celle qui lie la lignine au ratio C/N total. Néanmoins, on remarque que les pentes des droites de corrélation sont légèrement plus fortes avec le ratio C/N_s pour tous les organes et pour tous les métabolites. Par exemple, les pentes des droites passent dans les FED, FD, tiges et racines de 0.92, 0.085, 0.13, 0.3 mg.g⁻¹ MS par unité de ratio C/N total à 1.12, 0.11, 0.17, 0.39 mg.g⁻¹ MS par unité de ratio C/N_s.

Concernant le ratio C/N_r, les valeurs ont fortement changé. Néanmoins, les coefficients de corrélation R restent quasiment identiques (Figure 58 et Figure 59).

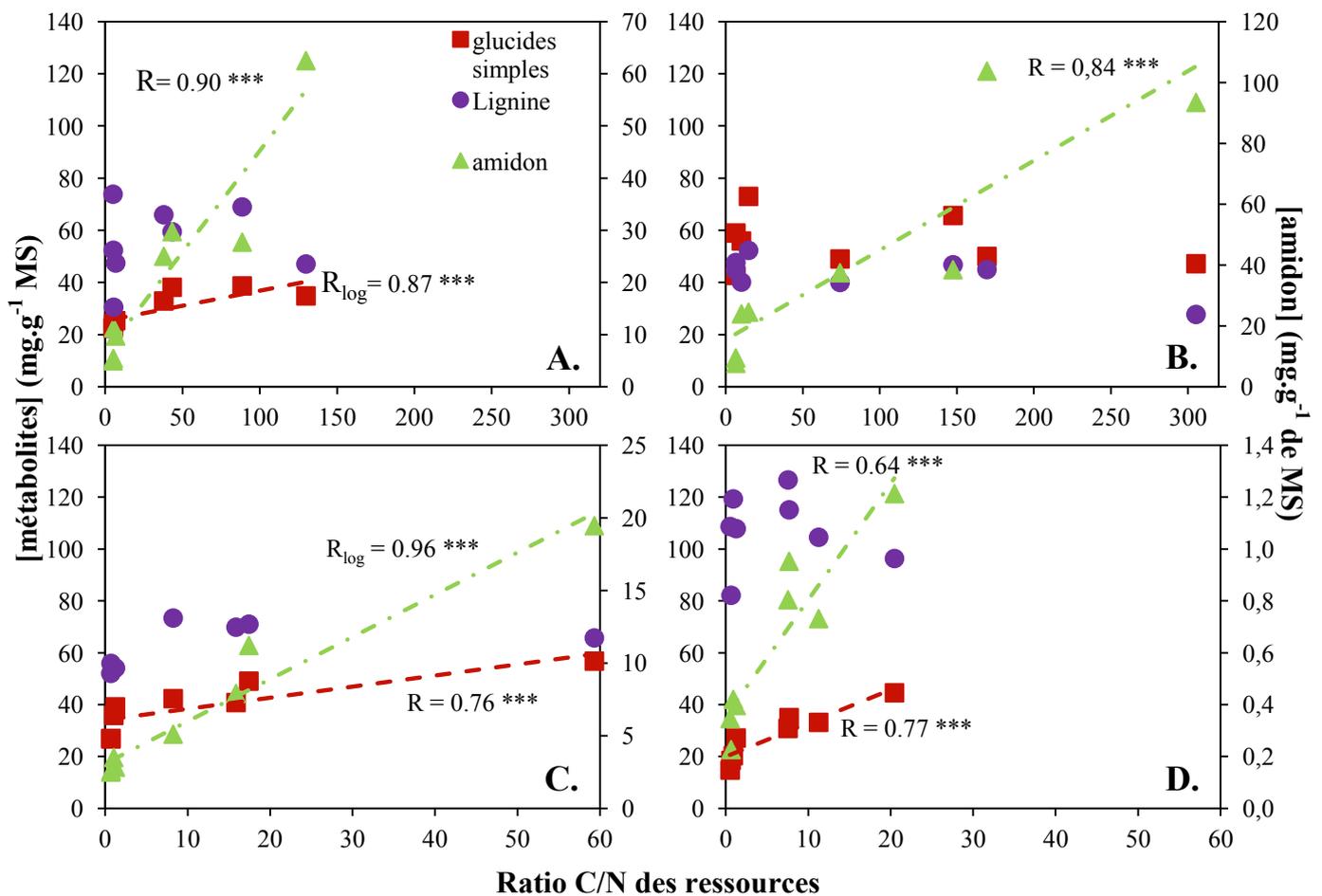


Figure 58: Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en glucides simples (■), amidon (▲) et lignine (●) en fonction du ratio C/N des ressources dans les FED (A.), les FD (B.), les tiges (C.) et les racines (D.) – Les droites de régressions sont représentées pour les glucides simples par des tirets, l'amidon par des tirets-points – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à ceux de la Figure 55 - n=3

Comme avec les deux autres ratios, on ne retrouve pas de corrélation entre le ratio C/N_r et la concentration en glucides simples dans les FD (Figure 58.B). Puisque la gamme de variation du ratio C/N_r est beaucoup plus large que celle du ratio C/N total, les pentes des droites de corrélation sont beaucoup plus faibles. Par exemple dans les FED, FD, tiges et racines, les droites pour l'amidon ont une pente de 0.34, 0.28, 0.28 et 0.03 mg.g^{-1} MS par unité de ratio C/N_r alors qu'elles ont une pente de 7.76, 8.36, 0.73, 0.1 mg.g^{-1} MS par unité de ratio C/N total respectivement (Figure 58 et Figure 54).

Les concentrations en lignine ne sont pas corrélées au ratio C/N des ressources même dans les FD où nous observons une faible corrélation négative avec le ratio C/N total (Figure 57 et Figure 58).

Comme pour les composés primaires et la lignine, les composés de défense montrent des corrélations similaires avec le ratio C/N_r (Figure 59). Les pentes sont là-aussi plus faibles du fait des larges gammes de ratio C/N des ressources. Pour les concentrations en acide chlorogénique, les pentes des droites de corrélation vont de 0.004 à 0.05 mg.g^{-1} MS par unité de ratio. Ces pentes allaient de 0.03 à 0.41 mg.g^{-1} MS par unité de ratio C/N total.

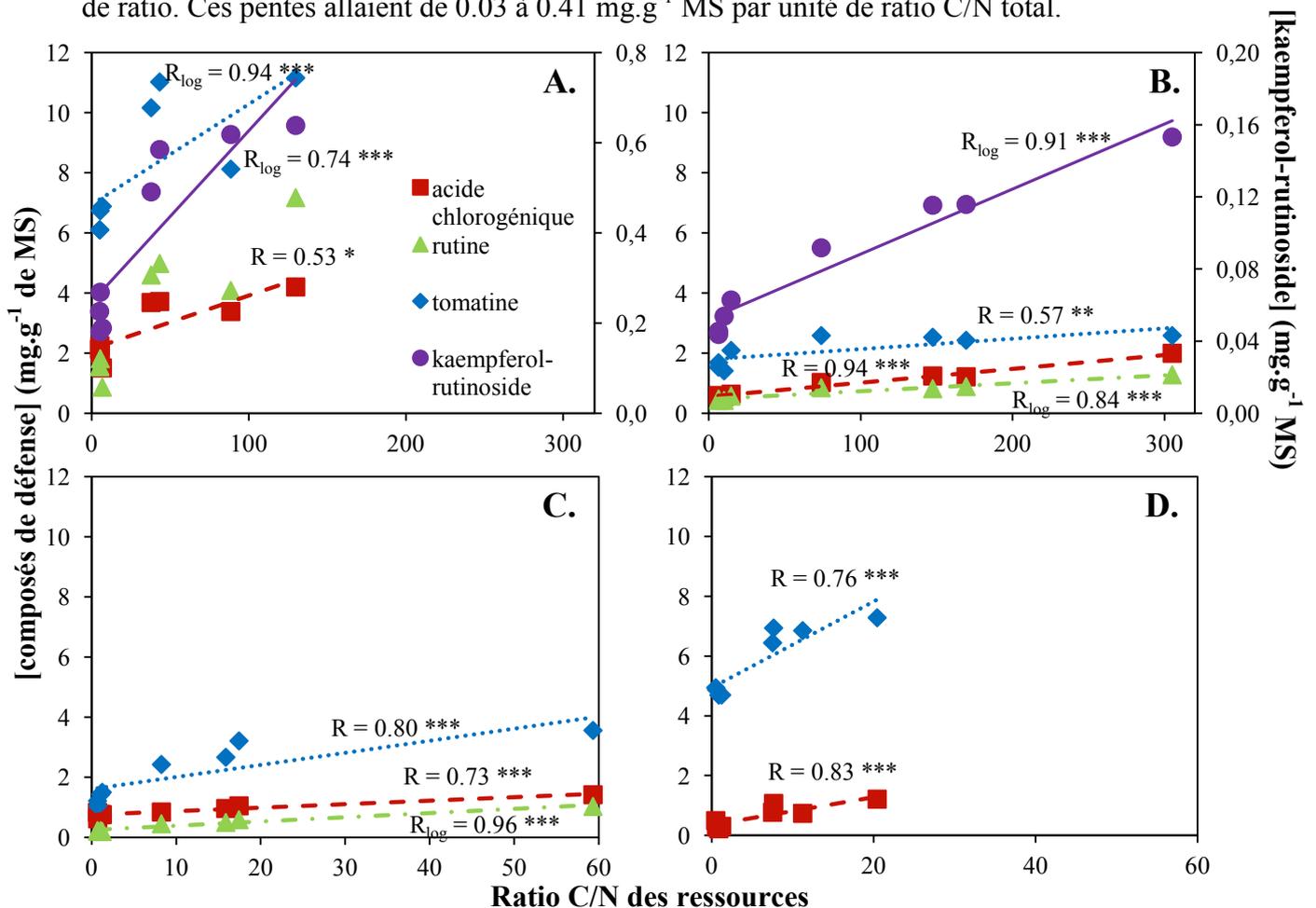


Figure 59: Concentrations (mg.g^{-1} MS) en acide chlorogénique (■), rutine (▲), kaempferol-rutinoside (●) et tomatine (◆) en fonction du ratio C/N des ressources dans les FED (A.), les FD (B.), les tiges (C.) et les racines (D.) – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à ceux de la Figure 55 - $n=3$

Quel que soit le calcul du ratio C/N, nous observons toujours une corrélation positive avec les concentrations en métabolites secondaires de défense (acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine) ainsi qu'avec l'amidon. Les concentrations en glucides simples sont aussi corrélées avec les trois ratios C/N sauf dans les feuilles développées. La lignine, molécule de fin de chaîne de la voie des phénylpropanoïdes, n'est pas affectée par les variations des ratios C/N, quels qu'ils soient.

9. Impact de la forme d'azote sur les métabolismes primaire et secondaire

Nous avons vu précédemment que la forme de l'azote en solution nutritive (nitrate seul ou en mélange avec NH_4^+) affectait fortement les concentrations en carbone et azote des tissus végétaux.

Concernant l'effet sur les métabolites primaires, la concentration en glucides simples dans les FD et les racines est plus forte lorsque l'azote est fourni sous forme mixte (** - FD : 61.2 et 49.4 mg.g^{-1} MS et R : 31.3 et 24.8 mg.g^{-1} MS pour respectivement N_{mix} et N_{nit}). La concentration en amidon augmente uniquement dans les tiges sous LN lorsque la forme mixte est apportée (** - LN_{mix} : 13.7 et LN_{nit} : 8.2 mg.g^{-1} MS) alors que sous HN, la concentration en amidon n'est pas affectée.

Les composés secondaires sont moins sensibles à la forme d'azote en solution. En effet, seule la concentration en acide chlorogénique dans les FD est significativement affectée. Lorsque l'ammonium est présent dans la solution, le fait d'enrichir l'atmosphère en CO_2 permet d'augmenter la concentration en acide chlorogénique (*). Ceci n'est pas le cas lorsque l'azote est fourni en totalité par du nitrate. Sous LN et HC, la présence d'ammonium dans la solution augmente la concentration en acide chlorogénique (*). La présence d'ammonium sous LN augmente également la concentration en rutine dans les tiges mais cet effet est non significatif.

10. Discussions

10.1. Les traitements ont affectés la croissance et la concentration en métabolites primaires en cohérence avec la littérature

Les disponibilités en carbone et en azote ont défini une large gamme de ratio C/N dans tous les organes. Les ratios sont plus élevés sous CO_2 élevé et sous faible disponibilité en azote, comme l'ont observé Bazzaz (1990), Schädler *et al.* (2007) et Hoffland *et al.* (1999). La gamme de ratio est la plus grande dans les tiges avec un écart de 16 entre le plus faible et le plus fort ratio C/N, confirmant les données sur une autre solanacée (Matros *et al.*, 2006 sur tabac).

La croissance répond de façon cohérente aux traitements CO_2 et N : l'enrichissement en CO_2 augmente la biomasse sèche au travers d'une plus grande surface foliaire et d'un accroissement de la photosynthèse (sur feuilles jeunes), alors que la limitation en azote est suffisamment maîtrisée pour réduire significativement la biomasse sèche *via* une moindre

surface foliaire sans affecter significativement la photosynthèse nette par unité de surface. Des résultats similaires ont été rapportés sur tomates poussant dans des conditions proches (Adamowicz et Le Bot, 2008). Selon l'hypothèse de la GDB, les conditions qui restreignent la croissance mais pas la photosynthèse favorisent une production accrue en composés de défense.

L'amidon est le composé le plus réactif aux variations du ratio C/N. Dans les feuilles développées, sa concentration augmente 10 fois avec la gamme permise du ratio C/N alors que la biomasse sèche est réduite par 3 seulement (*i.e.* ce n'est pas un effet de dilution). Nos données confirment que la limitation en azote affecte davantage la croissance que l'assimilation en carbone comme c'est le cas dans les travaux d'Hoffland *et al.* (2000a). Dans ces circonstances, le surplus de carbone peut s'accumuler comme composé de réserve dans les feuilles. Dans les plantes limitées en azote, la plupart des glucides s'accumulent sous forme d'amidon. De plus, le nitrate est considéré comme un signal qui réprime le métabolisme de l'amidon dans les plants de tabac (Scheible *et al.*, 1997).

Les feuilles en développement se comportent de manière différente des feuilles adultes. En effet, les premières peuvent être considérées comme des puits de carbone alors que les secondes sont des organes sources, ce qui établit un gradient de ressources entre ces deux organes. Les concentrations en glucides sont probablement plus faibles dans les feuilles en développement car ils sont rapidement utilisés pour la croissance et la respiration des jeunes tissus.

10.2. Les composés de défense basés sur le carbone et l'azote sont positivement corrélés au ratio C/N

L'acide chlorogénique et la tomatine sont les seuls métabolites détectés dans tous les organes. Les tiges ne contiennent pas de kaempferol-rutinoside et les racines ne contiennent pas de rutine ni de kaempferol-rutinoside, ce qui a déjà été montré sur tomate (Larbat *et al.*, 2012a).

Les composés étudiés dérivés de la voie des phénylpropanoïdes (acide chlorogénique, rutine et kaempferol-rutinoside) sont positivement corrélés au ratio C/N. Ceci a déjà été montré dans les feuilles de tomate (Hoffland *et al.*, 2000a) et de tabac (Matros *et al.*, 2006), mais nous montrons ici que c'est aussi le cas des tiges et des racines de tomate.

Les feuilles en développement contiennent une plus forte concentration en composés de défense et elles sont aussi les plus sensibles au ratio C/N. Ces résultats sont cohérents avec l'observation de l'accumulation de métabolites secondaires à faible poids moléculaire essentiellement dans les bourgeons et les feuilles immatures. Lorsque les feuilles se développent, leurs concentrations déclinent (McKey, 1974) par un effet de dilution lié à l'expansion des feuilles (Bodnaryk et Palaniswamy, 1990; Zobel et Brown, 1990). Nos observations sont plus ou moins en conformité avec la théorie de défense optimale (ODT) prédisant que les parties de la plante qui sont plus susceptibles d'être attaquées sont plus fortement défendues. Les jeunes feuilles de tomate présentent bien un taux constitutif élevé de défense mais elle montre aussi une forte inductibilité par la disponibilité en ressources, ce qui

n'est pas décrit dans l'ODT. L'allocation des composés de défense aux tissus vulnérables représente un faible investissement énergétique pour la plante.

Le glycoalcaloïde tomatine est le composé de défense le plus concentré, dans tous les organes. Ce métabolite contenant de l'azote répond aux variations du ratio C/N suivant le même profil que les composés secondaires basés sur le carbone, ce qui est cohérent avec les résultats de Hoffland *et al.* (1999). Néanmoins, ceci est inattendu d'un point de vue trophique puisque la limitation en N (*i.e.* un fort ratio C/N) devrait limiter la synthèse de molécules contenant de l'azote (Bryant *et al.*, 1983). Une telle diminution a effectivement été observée pour la concentration de la nicotine chez le tabac (Baldwin *et al.*, 1994; Matros *et al.*, 2006). Pour expliquer le comportement antagoniste de ces plants limités en N, on peut penser que la synthèse des métabolites azotés est d'autant plus restreinte qu'ils sont riches en N, c'est à dire qu'ils ont un rapport C/N faible. Ainsi, le ratio C/N est plus faible dans la nicotine (C/N=5) que dans la tomatine (C/N=49). On suppose que sous limitation azotée, la faible absorption d'azote de la solution nutritive et le stockage d'azote par la plante reste néanmoins suffisante pour la synthèse de tomatine.

10.3. La forme d'azote influence les concentrations en acide chlorogénique

La gamme du ratio C/N a été fortement étendue avec une alimentation mixte fournissant 30% de l'azote sous forme d'ammonium. De plus, l'addition d'ammonium dans la solution nutritive a augmenté les concentrations en glucides des feuilles développées et des racines, quel que soit le niveau de disponibilité en azote. L'ammonium a augmenté les concentrations en amidon des tiges et en acide chlorogénique des feuilles développées sous LN. Nos résultats sont cohérents avec ceux d'anciennes études comme celle de Montanari *et al.* (2008). Ils montrent que la concentration en acide chlorogénique dans les feuilles d'*Echinacea angustifolia* augmente non significativement lorsque la plante pousse sous un ratio $\text{NO}_3:\text{NH}_4$ de 1:1 (de 75 à 242 μg d'acide chlorogénique. g^{-1} MS). De même, une diminution des concentrations en composés phénoliques dans les racines de carotte fertilisées par $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ en comparaison à une fertilisation avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou NH_4NO_3 a été montrée (Smoleń et Sady, 2009). Plus récemment, Lee et Paek (2012) ont montré que le ratio $\text{NH}_4:\text{NO}_3$ de 5:25 (mM) est le ratio optimal pour obtenir une forte concentration en composé bioactif tel que l'acide chlorogénique dans les racines adventives d'*Eleutherococcus koreanum* cultivée en bioréacteur. Ce ratio de 5:25 (16% de NH_4) est moitié de celui appliqué dans notre étude (30% NH_4). Au contraire, d'autres auteurs ont montré que la concentration en acide chlorogénique dans les racines est plus forte lorsque l'azote est apporté seulement par du nitrate (Montanari *et al.*, 2008). De ce fait, agir sur l'équilibre nitrate/ammonium dans la solution nutritive pourrait être un outil pour agir sélectivement sur les concentrations en certains métabolites. Les effets de l'ammonium sur les métabolites primaires ont été longuement décrits (Haynes et Goh, 1978; Chaillou et Lamaze, 1997), mais, les quelques études sur l'effet sélectif de l'ammonium sur les composés de défense sont assez récentes.

10.4. Les concentrations en lignine ne sont pas corrélées au ratio C/N, quel que soit l'organe considéré

La lignine, un produit de fin de chaîne de la voie des phénylpropanoïdes, représente un puits de carbone important. Elle assure diverses fonctions dont le maintien de la plante. Elle est en concentration plus élevée que les composés de défense que nous avons quantifiés. Nos résultats indiquent que la lignine ne répond pas aux traitements. Contrairement aux composés phénoliques et à la tomatine, la lignine n'est pas ou est peu sensible aux variations du ratio C/N, au stade physiologique étudié (jeunes plants au stade floraison au maximum). Sa concentration est négativement corrélée au ratio C/N dans les feuilles développées. En accord avec la plupart des théories, nous nous attendions à une plus forte lignification sous limitation azotée, mais ce ne fut pas le cas dans cette étude. Il est possible qu'une carence en azote plutôt qu'une simple limitation soit nécessaire pour obtenir cette réponse. Néanmoins, une étude récente de Løvdal *et al.* (2010) a conclu que, même en situation de carence totale en azote, la lignification des tiges n'était pas augmentée. Sous une telle limitation en azote, la plante ne priorise pas l'allocation de carbone pour la création de barrière physique mais favorise plutôt la production de composés répulsifs de défense (tels que l'acide chlorogénique ou la tomatine). Néanmoins, nous avons seulement étudié la concentration en lignine, et non sa composition qui pourrait être modifiée par une limitation en azote.

10.5. Restreindre le ratio C/N au pool des structures ou des ressources ne modifie pas les corrélations

Restreindre le ratio C/N au pool des structures modifie très peu les valeurs des ratios C/N. Nous ne voyons donc pas d'effet sur la force des corrélations avec les concentrations des métabolites.

Dans le pool de ressources azotées, nous avons intégré l'ammonium et le nitrate libre, ce dernier est rapporté comme étant le constituant majeur du pool métabolique de la tomate (Cárdenas-Navarro *et al.*, 1999; Huanosto Magaña *et al.*, 2009). Le métabolisme des phénylpropanoïdes étant stimulé par les changements des teneurs en nitrate, plutôt que par des métabolites azotés plus en aval (Fritz *et al.*, 2006b), nous supposons que les concentrations en phénylpropanoïdes allaient être plus fortement corrélées au ratio C/N des ressources plutôt qu'au ratio C/N total. La gamme de ratio C/N des ressources s'avère plus large que celle du ratio C/N total, mais les coefficients de corrélation ne sont pas meilleurs. Cela peut être dû à la limitation évidente de notre définition analytique des ressources carbonées et azotées. Par exemple, Huanosto Magaña *et al.* (2009) ont inclus les carboxylates non structuraux (principalement le malate et le citrate) dans le pool de ressources carbonées, et les acides aminés libres dans le pool de ressources azotées. Ils ont trouvé que les deux pools étaient variables avec la nutrition azotée. Mais la question est de savoir si une hypothétique amélioration d'une corrélation résultant d'une définition exhaustive des ressources est pertinente au regard de l'investissement analytique associé.

11. Conclusions

De nos résultats, nous pouvons extraire des tendances générales sur une large gamme de composés de défense. Les paramètres environnementaux agissent fortement sur les concentrations en métabolites secondaires. Considérant différents organes (feuilles en développement et développées, tiges et racines), notre étude fournit une distribution spatiale des ressources à la défense des plantes.

Ajouter de l'ammonium à la solution nutritive augmente la concentration en acide chlorogénique sous limitation azotée. La concentration en lignine n'est pas influencée par le ratio C/N. Le glycoalcaloïde tomatine contenant de l'azote suit la même réponse au ratio C/N que les composés de défense carbonés, et donc obéit à la même théorie de compromis entre croissance et défense.

Le ratio C/N apparaît comme un indicateur du statut de nutrition de la plante, dont les variations peuvent être corrélées à celles de nombreux composés formant une barrière chimique aux bioagresseurs (tomatine, acide chlorogénique, rutine et kaempferol-rutinoside). Comme le ratio C/N est étroitement corrélé avec les concentrations des principaux composés secondaires de défense, l'utilisation du rapport carbone/azote total des organes pour évaluer le statut de défense des plantes a un fort avantage pratique car il est facile à déterminer.

Le ratio C/N est un bon indicateur du compromis croissance/défense dans le cas d'une plante saine. Dans le cas d'une plante attaquée, la modification de paramètres environnementaux en affectant la croissance de la plante et les teneurs en composés chimiques pourrait affecter le comportement de bioagresseurs. Néanmoins, sa présence peut elle aussi perturber le fonctionnement de la plante et le compromis croissance/défense. Il est donc nécessaire de tester ce compromis dans le cas d'une interaction plante x environnement x bioagresseur, ce qui fait l'objet du prochain chapitre.

Partie 2 : Effets de la présence de bioagresseurs sur la croissance et les concentrations en principaux métabolites primaires et secondaires en fonction de la disponibilité en azote

Nous avons développé les conditions expérimentales qui nous permettent, *via* la disponibilité en azote du milieu, d'affecter le compromis entre les métabolismes, primaire et secondaire, chez la plante saine. Nous avons ainsi montré qu'une fertilisation azotée faible permet de limiter la croissance et d'influencer les concentrations en métabolites des organes. Dans cette deuxième partie, notre objectif est maintenant d'étudier le compromis croissance/défense dans le cas d'une plante agressée, limitée ou non dans sa croissance par la disponibilité en azote.

Nos hypothèses sont que le bioagresseur, par sa présence et son développement, affecte fortement les concentrations en métabolites primaires et secondaires. De nombreuses études ont montré que la plante répondait spécifiquement au bioagresseur. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier la réponse de la tomate à l'inoculation de 4 bioagresseurs différant par leur nature et/ou leur mode d'action : un insecte, *Tuta absoluta*, un champignon nécrotrophe, *Botrytis cinerea* et deux bactéries du genre *Pseudomonas*, *P. syringae* et *P. corrugata*. Des expériences d'inoculation contrôlée de bioagresseurs ont été réalisées dans deux phytotrons jumeaux, sur des jeunes plants de tomate (moins de 40 JAS) cultivés en hydroponie en conditions de disponibilité azotée pléthorique ou limitante pour la croissance. Lors de ces études, nous avons mesuré un grand nombre de paramètres (biomasses, échanges gazeux foliaires, ratio C/N, concentrations en principaux métabolites primaires et secondaires) dans différents organes plus ou moins éloignés du point d'infection. Cela nous a permis d'appréhender la répartition des ressources entre les processus de croissance et de défense et d'évaluer si l'agression de la plante modifiait ce compromis. L'étude des processus de répartition entre métabolismes manque souvent dans les publications antérieures même s'il est établi que les processus de réponse de la plante à une attaque de bioagresseur sont multiples et inter-dépendants ; les articles se focalisent souvent sur une seule voie de biosynthèse de métabolites de défense (Zacarés *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2012), ou sur l'effet de l'attaque sur la croissance et le rendement de la plante (Bonfig *et al.*, 2006; Berber *et al.*, 2010). De plus, dans notre travail, nous avons pu affiner certains résultats sur la répartition des ressources au sein de la voie des phénylpropanoïdes par des investigations sur les expressions des gènes clés de cette voie, complétant ainsi la démarche en s'adressant à des stades précoces de la réponse de la plante aux bioagresseurs.

Au cours de cette série d'expérimentations, nous avons dû faire face à un problème récurrent, malgré plusieurs essais, concernant l'efficacité d'infection des plants de tomate par *Botrytis cinerea*. En effet, sur un total de 48 plants inoculés, seules 6 d'entre eux ont développé un chancre. Ainsi, les résultats de cette étude ne sont pas présentés, mais différentes hypothèses seront avancées dans la partie « Discussions » pour expliquer le faible nombre de plantes infectées.

Les résultats de l'étude sur les deux pathosystèmes tomate – *Pseudomonas* font l'objet d'un article en préparation pour la revue *Phytopathology* : « Responses of the secondary

metabolism of tomato to infection by two pathogenic *Pseudomonas* species (*P. syringae* and *P. corrugata*) : spatio-temporality and N limitation effects ».

1. Matériels et méthodes (rappels)

Le dispositif expérimental complet est développé dans le chapitre 2.2.2. Nous avons réalisé les expérimentations en série dans deux phytotrons jumeaux à l'INRA d'Avignon. Nous avons choisi le nombre de répétitions et les modalités de culture en fonction du bioagresseur étudié. Le Tableau 10 récapitule les différents facteurs appliqués, les dates de récoltes et les organes récoltés.

Pour les échantillons de l'expérimentation *Pseudomonas*, les paramètres mesurés sont le ratio C/N, les concentrations en métabolites primaires (glucose, fructose, saccharose et amidon), les concentrations en métabolites secondaires (acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine) pour tous les organes récoltés (feuille inoculée, « systémique » et tiges). De plus, pour cette expérimentation uniquement, nous avons analysé à la récolte 2 la teneur en lignine de la feuille inoculée puis aux récoltes 1 et 2, l'expression de gènes clés impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes dans la feuille inoculée.

Pour les échantillons de l'expérimentation *Tuta absoluta*, nous avons restreint notre analyse à la seule feuille inoculée. En effet, ayant observé qu'elle répondait faiblement à la présence de la larve, nous en avons donc déduit que les feuilles « systémiques » ou les tiges, éloignées de la zone agressée, ne répondraient pas à l'agresseur. Les paramètres mesurés sur la feuille attaquée sont les mêmes que ceux analysés dans l'expérimentation *Pseudomonas*.

La feuille dite « systémique » correspond à la feuille adjacente à la zone d'inoculation (au dessous et/ou au dessus).

Expérimentation	Facteurs		répétitions par phytotron et par traitement	Dates de récolte	organes récoltés
	facteur azote	facteur présence du bioagresseur			
Expérimentation <i>Tuta absoluta</i>	2 modalités : HN et LN	2 modalités : - Inoculé : dépôt d'un œuf sur la feuille N°5 ensachée - Témoin : feuille N°5 ensachée	15 plantes inoculées 3 plantes témoin	Récolte : 16 jours après dépôt - 39 JAS	Feuille inoculée Feuille "système" Tige Racines
Expérimentation <i>Pseudomonas syringae</i> et <i>P. corrugata</i>	2 modalités : HN et LN	4 modalités : - Inoculé par <i>P. syringae</i> (sur feuille) - Inoculé par <i>P. corrugata</i> (sur tige) - Témoin mode d'inoculation <i>P. syringae</i> - Témoin mode d'inoculation <i>P. corrugata</i>	6 plantes (3 plantes par récolte)	Récolte 1 : 1 jours après inoculation - 27 JAS Récolte 2 : 12 jours après inoculation - 38 JAS	Zone ou feuille inoculée Feuille "système" Tige Racines

Tableau 10 : Récapitulatif des facteurs appliqués, du nombre de répétition, des dates de récoltes et des organes récoltés lors des expérimentations sur *Tuta absoluta* et sur *Pseudomonas syringae* et *P. corrugata*.

2. Etude de deux pathosystèmes tomate – bactérie : *Pseudomonas syringae* et *Pseudomonas corrugata*

2.1. Effet de l'inoculation et de la disponibilité en azote sur les paramètres de croissance et les échanges gazeux

2.1.a. Biomasse sèche et surfaces foliaires

La production de biomasse sèche des parties aériennes et la surface foliaire de la feuille « systémique » ne sont pas affectées, 24h après inoculation de *P. syringae*. En revanche, la surface foliaire de la feuille inoculée est plus faible ($\div 1.2$ - **) que celle des feuilles inoculées avec de l'eau et ce, quelle que soit la fertilisation en N (Tableau 11). La biomasse sèche et les surfaces foliaires diminuent ($\div 1.7$ à 2 - ***) sous faible fertilisation azotée (Tableau 11).

Douze jours après inoculation, la masse sèche des parties aériennes est de 3.6 à 5.8 fois plus élevée que celle observée 24h après inoculation, ce qui indique une croissance active (Tableau 11). Après 12 jours d'infection, la biomasse sèche aérienne et la surface foliaire de la feuille infectée diminuent ($\div 1.2$ * et $\div 1.5$ ** respectivement) en comparaison des plantes témoins. La surface foliaire de la feuille « systémique » n'est, par contre, pas affectée (Tableau 11). Tout comme après 24h d'infection, la masse sèche et les surfaces foliaires sont plus faibles sous limitation azotée (Tableau 11).

	LN		HN	
	Te S	S	Te S	S
24h après inoculation (R1)				
Masse sèche aérienne (g)	1.5 (± 0.23)	1.2 (± 0.41)	2.5 (± 0.43)	2.5 (± 0.49)
Surface foliaire FS (cm²)	151 (± 21.0)	129 (± 42.8)	263 (± 35.2)	273 (± 46.2)
Surface foliaire Fi (cm²)	94 (± 10.6)	74 (± 19.9)	165 (± 18.8)	145 (± 24.0)
12 jours après inoculation (R2)				
Masse sèche aérienne (g)	5.5 (± 0.54)	4.9 (± 0.82)	14.5 (± 2.92)	11.4 (± 1.34)
Surface foliaire FS (cm²)	109 (± 12.0)	121 (± 18.0)	171 (± 30.9)	167 (± 20.1)
Surface foliaire Fi (cm²)	135 (± 34.1)	89 (± 18.9)	259 (± 89.9)	169 (± 19.2)

Tableau 11 : Masses sèches aériennes (g), surfaces foliaires (cm²) de la feuille « systémique » (FS) et de la feuille inoculée (Fi) des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h (R1) et 12 jours (R2) après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (\pm écart-type) - n=6

L'inoculation de *P. corrugata* n'affecte ni l'accumulation de masse sèche, ni la surface foliaire de la feuille « systémique », et ce, quelle que soit la durée de l'infection (24h ou 12 jours après inoculation). Elles sont seulement diminuées (***) par une faible disponibilité en azote (Tableau 12).

	LN		HN	
	Te C	C	Te C	C
	24h après inoculation			
Masse sèche aérienne (g)	1.2 (±0.35)	1.2 (±0.28)	2.3 (±0.15)	2.7 (±0.53)
Surface foliaire FS (cm²)	148 (±41.6)	140 (±28.5)	306 (±17.9)	344 (±55.5)
	12 jours après inoculation			
Masse sèche aérienne (g)	5.2 (±0.78)	5.1 (±0.60)	12.7 (±2.92)	12.0 (±1.51)
Surface foliaire FS (cm²)	157 (±34.6)	127 (±15.6)	167 (±18.4)	190 (±17.9)

Tableau 12 : Masses sèches aériennes (g), surfaces foliaires (cm²) de la feuille « systémique » (FS) des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h (R1) et 12 jours (R2) après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

2.1.b. Echanges gazeux foliaires

Vingt-quatre heures après inoculation, le taux de transpiration n'est affecté ni par la disponibilité en azote, ni par l'inoculation de *P. syringae* (Tableau 13). Par contre, l'inoculation diminue le taux d'assimilation nette de CO₂ (÷ 1.5 - ***) et augmente le taux de respiration à l'obscurité (x 1.2 à 1.3 - ***) (Tableau 12). Une disponibilité en azote faible diminue le taux de respiration à l'obscurité (÷ 1.2 à 1.3 - **) alors que le taux d'assimilation nette de CO₂ n'est pas modifié (Tableau 13).

	LN		HN	
	Te S	S	Te S	S
	24h après inoculation			
Taux de transpiration (mmol H₂O.m⁻².s⁻¹)	6.1 (±0.56)	5.8 (±0.98)	5.7 (±0.32)	5.4 (±0.30)
Taux d'assimilation nette de CO₂ (µmol CO₂.m⁻².s⁻¹)	7.7 (±1.05)	5.2 (±1.25)	7.9 (±0.85)	5.4 (±1.85)
Taux de respiration à l'obscurité (µmol CO₂.m⁻².s⁻¹)	1.8 (±0.33)	2.2 (±0.39)	2.1 (±0.33)	2.8 (±0.47)

Tableau 13 : Taux de transpiration (mmol H₂O.m⁻².s⁻¹), taux d'assimilation nette de CO₂ (µmol CO₂.m⁻².s⁻¹) et taux de respiration à l'obscurité (µmol CO₂.m⁻².s⁻¹) des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

L'inoculation de *P. corrugata* n'affecte ni le taux de transpiration, ni le taux d'assimilation nette de CO₂, ni le taux de respiration à l'obscurité. Ces paramètres ne sont pas non plus modifiés par la disponibilité en azote (Tableau 14).

	LN		HN	
	Te C	C	Te C	C
	24h après inoculation			
Taux de transpiration (mmol H ₂ O.m ⁻² .s ⁻¹)	5.5 (±0.40)	5.5 (±0.55)	5.3 (±0.86)	5.2 (±0.44)
Taux de photosynthèse (μmol CO ₂ .m ⁻² .s ⁻¹)	7.5 (±0.64)	7.8 (±0.68)	7.1 (±1.66)	6.7 (±1.46)
Taux de respiration à l'obscurité (μmol CO ₂ .m ⁻² .s ⁻¹)	1.8 (±0.47)	2.0 (±0.32)	2.3 (±0.47)	2.0 (±0.26)

Tableau 14 : Taux de transpiration (mmol H₂O.m⁻².s⁻¹), taux d'assimilation nette de CO₂ (μmol CO₂.m⁻².s⁻¹) et taux de respiration à l'obscurité (μmol CO₂.m⁻².s⁻¹) des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

Vingt-quatre heures après inoculation, la biomasse aérienne est seulement affectée par la disponibilité en azote (diminution sous LN). Douze jours après, elle est diminuée par l'inoculation de *P. syringae*. L'effet négatif du traitement LN est toujours visible. Quelle que soit la durée d'inoculation, *P. corrugata* ne l'affecte pas.

La surface foliaire de la feuille « systémique » est seulement affectée par la disponibilité en azote (diminution sous LN), 24h et 12 jours après inoculation, alors que la surface foliaire de la feuille inoculée est diminuée par l'inoculation de *P. syringae*. L'effet négatif de la limitation en azote est aussi visible, 24 h et 12 jours après l'inoculation.

Alors que la présence de *P. corrugata* n'affecte pas les échanges gazeux, l'inoculation de *P. syringae* diminue le taux d'assimilation en CO₂ et augmente la respiration à l'obscurité, 24 h après inoculation. La disponibilité en azote ne modifie pas le taux d'assimilation en CO₂.

2.2. Ratio C/N, concentrations en métabolites et expressions de gènes clés dans la zone infectée

2.2.a. Ratio C/N des tissus infectés

L'infection de la feuille par *P. syringae* n'affecte pas son ratio C/N, quel que soit le moment de la récolte. Ce ratio est en revanche augmenté (x 1.3 à 1.8 - ***) sous faible nutrition azotée dès 24h (Tableau 15).

		Ratio C/N	
		24h après inoculation	12 jours après inoculation
		LN	Te S
	S	10.0 (±1.12)	15.9 (±2.30)
HN	Te S	7.4 (±0.10)	10.6 (±1.71)
	S	7.5 (±0.28)	8.9 (±1.01)

Tableau 15 : Ratio C/N de la feuille inoculée des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

L'inoculation de *P. corrugata* n'affecte pas le ratio C/N de la zone inoculée, quel que soit le moment de la récolte (Tableau 15). Comme pour les feuilles, une faible disponibilité en azote augmente le ratio C/N de la zone de tige inoculée, 24h (x 2.3 - ***) et 12 jours après inoculation (x 2.1 à 2.2 - ***) (Tableau 16).

La limitation en azote augmente plus fortement le ratio C/N des tiges inoculées que des feuilles inoculées (Tableau 15 et 16).

		Ratio C/N	
		24h après inoculation	12 jours après inoculation
LN	Te C	14.1 (± 3.76)	20.2 (± 4.11)
	C	15.4 (± 4.16)	22.0 (± 5.08)
HN	Te C	6.1 (± 0.50)	9.1 (± 0.55)
	C	6.5 (± 0.23)	10.5 (± 2.08)

Tableau 16 : Ratio C/N de la zone de tige inoculée des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (\pm écart-type) - n=6

2.2.b. Concentrations en métabolites primaires et secondaires dans la zone inoculée

- Cas de l'infection par *P. syringae*

Les concentrations en glucose et fructose sont fortement diminuées par la présence de *P. syringae* dans la feuille infectée, quelle que soit la durée après inoculation (24h après : $\div 5.6$ à 13 *** et 12 jours après : $\div 2.2$ à 4.8 **) (Figure 60 et Tableau 17). Cette diminution est plus importante après 24h qu'après 12 jours d'inoculation.

Vingt-quatre heures après inoculation, nos données font ressortir une interaction significative [Azote x Inoculation] sur les concentrations en glucose et fructose (*). Les témoins LN inoculés par de l'eau ont des concentrations plus fortes (x 1.25 à 1.28) que les témoins HN. Par contre, en présence de la bactérie, les feuilles HN et LN ont quasiment les mêmes teneurs en glucose et fructose. Cet effet disparaît 12 jours après inoculation (Figure 60 et Tableau 17).

Quel que soit le temps d'observation après l'inoculation, la concentration en saccharose des feuilles inoculées n'est influencée ni par la présence de *P. syringae*, ni par la disponibilité en azote dans le milieu (Figure 60 et Annexe 3).

L'inoculation de *P. syringae* n'affecte pas les concentrations en amidon dans la feuille inoculée, 24h après. En revanche, elles sont diminuées ($\div 3.7$ à 4 - ***) 12 jours après, quel que soit le traitement azoté (Figure 60 et Tableau 17). La faible disponibilité en azote augmente la concentration en amidon après 24h (x 1.5 à 2.3 - ***) et 12 jours (x 2.2 à 2.3 - **) (Figure 60 et Tableau 17).

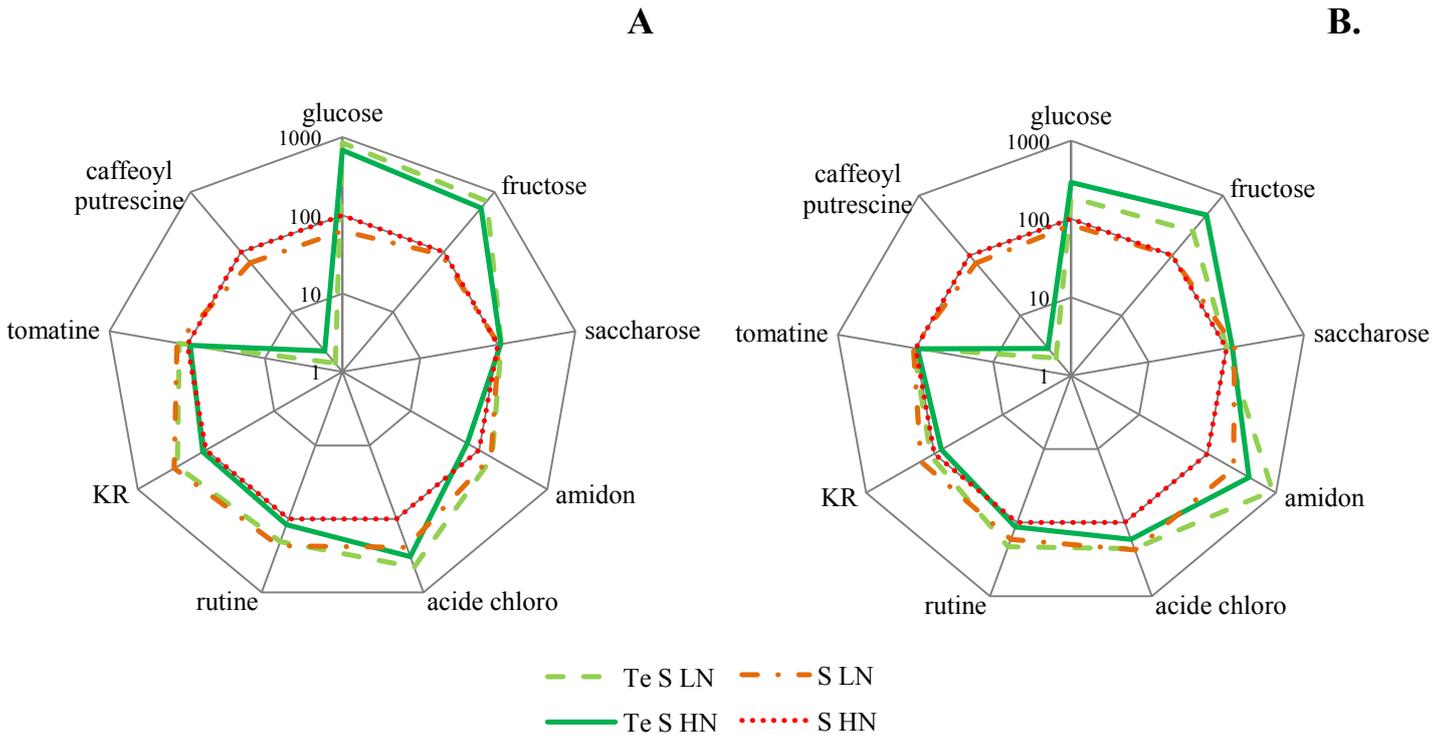


Figure 60 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de S HN (rouge = 100%)), en coordonnée logarithmique, des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique (acide chloro), rutine, kaempferol-rutinoside (KR), tomatine et caffeoyl putrescine dans la feuille inoculée, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te S LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te S HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. syringae* sous faible azote (S LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. syringae* sous fort azote (S HN : rouge-ligne pointillée) – n=6

La concentration en acide chlorogénique de la feuille inoculée est diminuée ($\div 1.9$ sous LN ; $\div 3.4$ sous HN - ***), 24h après l'infection par *P. syringae*, quel que soit le traitement azoté de la plante (Figure 60 et Tableau 17). En revanche, 12 jours après inoculation, cet effet est dépendant de la disponibilité en azote (*): la diminution de la concentration en acide chlorogénique par l'infection est maintenue chez les plantes HN ($\div 1.7$), alors que cet effet disparaît sous LN. De plus, cette diminution de concentration est plus faible après 12 jours que 24h après (Figure 60 et Tableau 17). La concentration en kaempferol-rutinoside (KR) augmente 12 jours après l'inoculation de *P. syringae* ($\times 1.3$ à 1.4 - *) (Annexe 3). Les concentrations en rutine et tomatine ne sont pas affectées par l'inoculation de *P. syringae*, quel que soit le moment de la récolte (Figure 60 et Annexe 3).

Indépendamment de l'infection et comme précédemment observé dans la partie 1 de ce chapitre, les concentrations en acide chlorogénique, tomatine, rutine et kaempferol-rutinoside sont augmentées dans les feuilles des plants cultivés sous LN (Figure 60, Tableau 17 et Annexe 3).

Par ailleurs, lors de l'analyse de la composition des tissus en composés phénoliques, la comparaison de profils HPLC des feuilles inoculées par *P. syringae* et des feuilles témoins nous a permis d'observer la forte accumulation d'un composé suite à l'infection (Figure 61). Ce composé a été identifié comme étant du caffeoyl putrescine, un composé de la famille des phénolamides (paragraphe 3.4.c. du chapitre 2). Vingt-quatre heures après inoculation, les

valeurs de sa concentration dans les feuilles inoculées sont très fortement augmentées par rapport à celles des témoins (x 42 - ***) quelle que soit la disponibilité en azote. Nous retrouvons cet effet positif de l'inoculation, 12 jours après (x 32 à 40 - ***) (Figure 60 et Tableau 17).

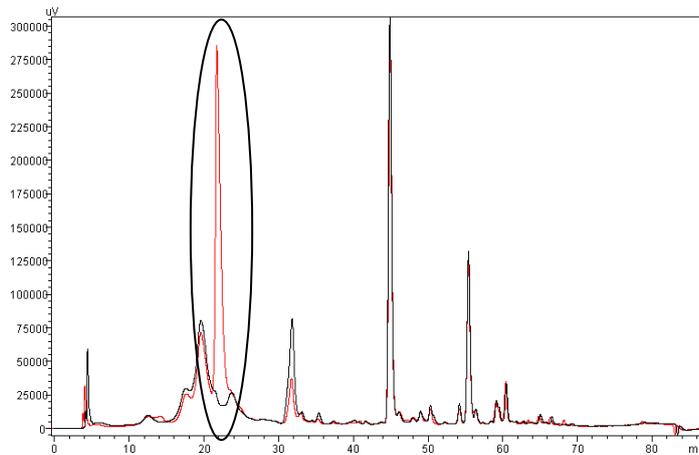


Figure 61 : Comparaison entre deux chromatogrammes UV – le trait noir représente Te S HN et le trait rouge représente S HN

La faible disponibilité en azote diminue la concentration en caffeoyl putrescine dans la feuille inoculée, seulement lorsque la bactérie *P. syringae* est présente, 24 heures après inoculation ($\div 1.5$ - **). Ce résultat est opposé à l'augmentation des concentrations des autres composés secondaires étudiés (acide chlorogénique, rutine, KR et tomatine) observée sous LN. Nous retrouvons un effet positif d'une disponibilité forte en azote, 12 jours après inoculation (x 1.3 à 1.7 - *).

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Glucose		Fructose		Amidon	
LN	Te S	10.5 (± 2.28)	3.6 (± 1.34)	10.9 (± 2.01)	5.4 (± 1.74)	19.2 (± 3.09)	13.1 (± 5.75)
	S	0.8 (± 0.38)	1.6 (± 0.73)	1.4 (± 0.94)	2.1 (± 0.72)	18.7 (± 4.35)	3.5 (± 2.05)
HN	Te S	8.4 (± 2.11)	5.6 (± 3.06)	8.5 (± 1.63)	10.1 (± 6.82)	8.4 (± 0.76)	6.0 (± 4.58)
	S	1.2 (± 0.62)	1.9 (± 1.01)	1.5 (± 0.82)	2.1 (± 0.91)	12.4 (± 2.69)	1.5 (± 0.61)
		Acide chlorogénique		Caffeoyl putrescine			
LN	Te S	0.56 (± 0.117)	0.20 (± 0.017)	0.02 (± 0.006)	0.03 (± 0.032)		
	S	0.30 (± 0.198)	0.21 (± 0.050)	0.84 (± 0.099)	1.19 (± 0.280)		
HN	Te S	0.41 (± 0.103)	0.15 (± 0.047)	0.03 (± 0.018)	0.05 (± 0.027)		
	S	0.12 (± 0.029)	0.09 (± 0.013)	1.27 (± 0.258)	1.59 (± 0.360)		

Tableau 17 : Concentrations ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) en glucose, fructose, amidon, acide chlorogénique et caffeoyl putrescine dans la feuille inoculée des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (\pm écart-type) - n=6 – Les valeurs en saccharose, rutine et tomatine sont consignées en Annexe 3

- Cas de l'infection par *P. corrugata*

Vingt-quatre heures après inoculation des tiges par *P. corrugata*, nous observons une augmentation de la concentration en glucose et fructose (x 1.8 à 2.2 - *** et x 1.5 à 2 - ** respectivement) dans la zone infectée. Cet effet n'est plus observé 12 jours après inoculation (Tableau 18 et Figure 62).

Le traitement LN augmente la concentration en glucose des tiges inoculées (24h après : x 1.4 à 1.7 ** - 12 jours après : x 1.9 à 2.2 ***) mais pas celle du fructose (Figure 62 et Tableau 18).

L'inoculation de *P. corrugata* augmente la concentration en saccharose (x 1.2 - *) dans la tige infectée, après 24h. Cet effet n'est plus observé 12 jours après l'inoculation. La concentration en saccharose est aussi diminuée sous LN, quel que soit le moment de la récolte (24h après : ÷ 1.1 à 1.3 ** - 12 jours après : ÷ 1.2 à 1.7 ***) (Figure 62 et Tableau 18).

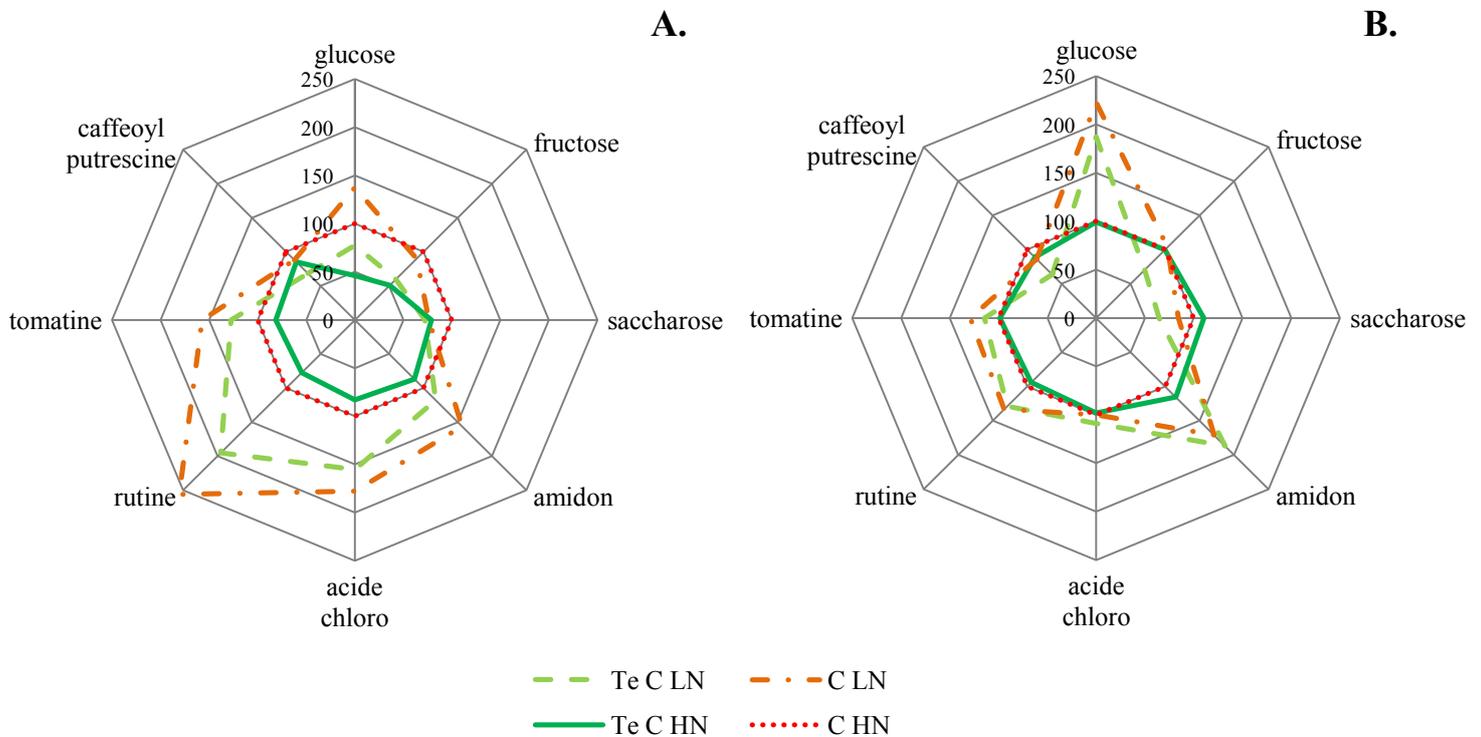


Figure 62 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de C HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, tomatine et caffeoyl putrescine dans la tige inoculée, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te C LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te C HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. corrugata* sous faible azote (C LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. corrugata* sous fort azote (C HN : rouge-ligne pointillée) – n=6

L'inoculation par *P. corrugata* ne modifie pas les concentrations en amidon quelle que soit la récolte. Par contre, la faible disponibilité en azote augmente sa concentration aux 2 récoltes (24h après x 1.3 à 1.6 ** – 12 jours après x 1.6 à 1.7 ***) (Annexe 4). La concentration en amidon dans les tiges inoculées est 8 fois plus faible que celle des feuilles inoculées.

L'inoculation de *P. corrugata* ne modifie pas la concentration en acide chlorogénique dans la zone infectée, comme nous l'observons pour *P. syringae*. Néanmoins, sa présence augmente la concentration en rutine (x 1.3 à 1.4 - *) et en tomatine (x 1.2 - ***) 24h après inoculation. En revanche, nous ne retrouvons plus cet effet, 12 jours après inoculation (Figure 62 et Tableau 18).

Comme observé dans la partie 1 de ce chapitre, les concentrations en acide chlorogénique, rutine et en tomatine (***) augmentent sous LN, 24h après inoculation. Douze jours après, on retrouve des concentrations plus élevées en rutine (***) et tomatine (*) sous LN par rapport à HN.

Les concentrations en caffeoyl putrescine ne sont influencées ni par l'inoculation de *P. corrugata*, ni par la disponibilité en azote dans le milieu (Figure 62 et Annexe 4), et ceci aux deux récoltes.

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Glucose		Fructose		Saccharose	
LN	Te C	5.9 (±1.00)	18.8 (±7.09)	2.5 (±1.91)	5.3 (±2.59)	15.6 (±1.05)	16.3 (±3.80)
	C	10.5 (±3.99)	22.4 (±2.39)	3.7 (±1.48)	7.8 (±1.85)	16.4 (±2.08)	21.2 (±4.87)
HN	Te C	3.5 (±0.58)	10.0 (±3.01)	2.1 (±0.56)	7.5 (±1.99)	17.0 (±4.02)	27.8 (±5.70)
	C	7.7 (±2.65)	10.1 (±2.44)	4.2 (±1.30)	7.5 (±1.82)	21.5 (±2.16)	25.2 (±5.77)
		Rutine		Tomatine			
LN	Te C	0.19 (±0.05)	0.17 (±0.033)	6.5 (±1.05)	8.0 (±1.47)		
	C	0.26 (±0.077)	0.17 (±0.023)	8.0 (±0.79)	9.1 (±1.80)		
HN	Te C	0.08 (±0.014)	0.12 (±0.03)	4.2 (±0.76)	6.9 (±1.21)		
	C	0.10 (±0.026)	0.13 (±0.011)	5.1 (±0.52)	7.0 (±0.96)		

Tableau 18 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en glucose, fructose, saccharose, rutine et tomatine dans la tige inoculée des plantes témoins (Te C) ou inocuées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 - Les valeurs en amidon, acide chlorogénique et caffeoyl putrescine sont consignées en Annexe 4.

Vingt-quatre heures comme 12 jours après inoculation, le ratio C/N est affecté seulement par le facteur « azote » alors que les concentrations en métabolites primaires et secondaires sont fortement modifiées par la présence des pathogènes :

- L'inoculation de *P. syringae* diminue fortement les concentrations en glucose et fructose, 24h et 12 jours après inoculation, alors que la concentration en saccharose n'est pas affectée. La concentration en amidon diminue en présence de *P. syringae*, 12 jours seulement après l'inoculation. La concentration en acide chlorogénique diminue, quelle que soit la disponibilité en azote 24h après l'inoculation, et seulement sous HN, 12 jours après. Le caffeoyl putrescine est une molécule spécifique de la réponse à *P. syringae*, car sa concentration augmente fortement après son inoculation alors qu'elle n'est pas affectée par celle de *P. corrugata*. Sa concentration est toujours élevée 12 jours après inoculation.
- L'inoculation de *P. corrugata* augmente les concentrations en glucose, fructose, saccharose, rutine et tomatine en 24h, mais cet effet disparaît 12 jours après.

- Une faible disponibilité en azote augmente la concentration en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine, aux deux récoltes. Inversement, la concentration en caffeoyl-putrescine de la feuille inoculée répond positivement à la disponibilité en azote.

2.2.c. Expression des gènes de la voie des phénylpropanoïdes et des phénolamides

Afin de mieux comprendre les régulations engendrées par les différents traitements sur la voie de biosynthèse des polyphénols et des phénolamides, nous avons suivi l'expression de quelques gènes clés impliqués dans cette voie de synthèse (*PAL5*, *HQT*, *F3H*, *SIPHT1* et 2) (Figure 63).

Leur suivi fournit ainsi des indicateurs d'entrée de carbone dans la voie des phénylpropanoïdes (*PAL5*), de synthèse de l'acide chlorogénique (*HQT*), de caffeoyl putrescine (*SIPHT*) et de flavonoïdes (*F3H*).

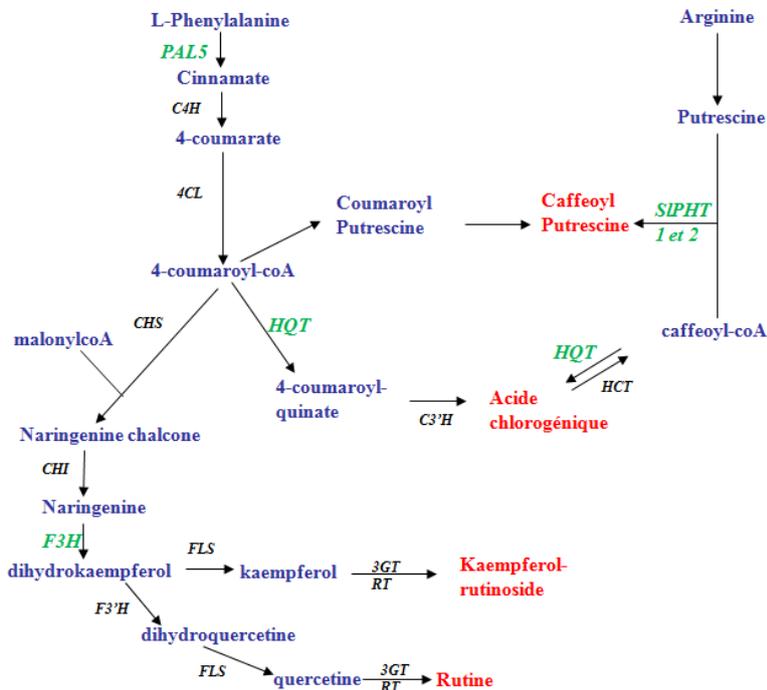


Figure 63 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes reliée à la voie de biosynthèse des phénolamides. Les molécules et les gènes étudiés sont inscrits en rouge et vert respectivement. Le gène *PAL5* est le gène principalement exprimé chez la tomate codant pour la phénylalanine ammonia lyase (PAL : phénylalanine ammonia-lyase) - L'expression du gène *HQT* (hydroxycinnamoyl quinate transférase) est essentiel à la synthèse de l'acide chlorogénique. Le gène *F3H* (flavanone 3-hydroxylase) est impliqué dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes. L'enzyme PHT (putrescine N-hydroxycinnamoyl transférase) est essentielle à la synthèse du caffeoyl putrescine et les deux copies de gènes codant pour des PHT putatives chez la tomate (*SIPHT1* et *SIPHT2* ; cf paragraphe 3.4.a du chapitre 2) sont donc supposées importantes pour l'accumulation de ce composé. C4H : cinnamate 4 hydroxylase. 4CL : 4-coumarate CoA ligase. CHS : chalcone synthase. CHI : chalcone isomérase. FLS : Flavonol synthase. 3GT : flavonoïde-3-O-glucosyltransférase. RT : flavonoïde 3-O-glucoside-rhamnosyl transférase. F3'H : flavonoïde 3'-hydroxylase. C3H : p-coumaroyl ester 3-hydroxylase. HCT : hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinat transférase. D'après Larbat *et al.* (2012b)

- Cas de l'infection par *P. syringae*

L'inoculation de *P. syringae*, conduit, sous 24h, à une diminution du niveau d'expression de *PAL5* ($\div 6$ en comparaison du témoin) chez les plantes sous forte nutrition azotée et une diminution des niveaux d'expression de *F3H* ($\div 2$ sous LN ; $\div 15$ sous HN) et *HQT* ($\div 2$ sous LN ; $\div 1.5$ sous HN) quel que soit le niveau d'azote (Figure 64). Pour ces trois gènes, les effets ne sont plus maintenus, 12 jours après.

Une faible nutrition azotée affecte aussi le niveau d'expression de ces gènes sous 24h. Ainsi, *PAL5*, dans les feuilles inoculées par de l'eau, est réprimé d'un facteur 6 et *F3H* est induit d'un facteur 2 à 3, tandis qu'*HQT* n'est pas affecté. De même que pour l'effet de l'infection, aucun effet de l'azote n'est observé sur l'expression de ces trois gènes, 12 jours après.

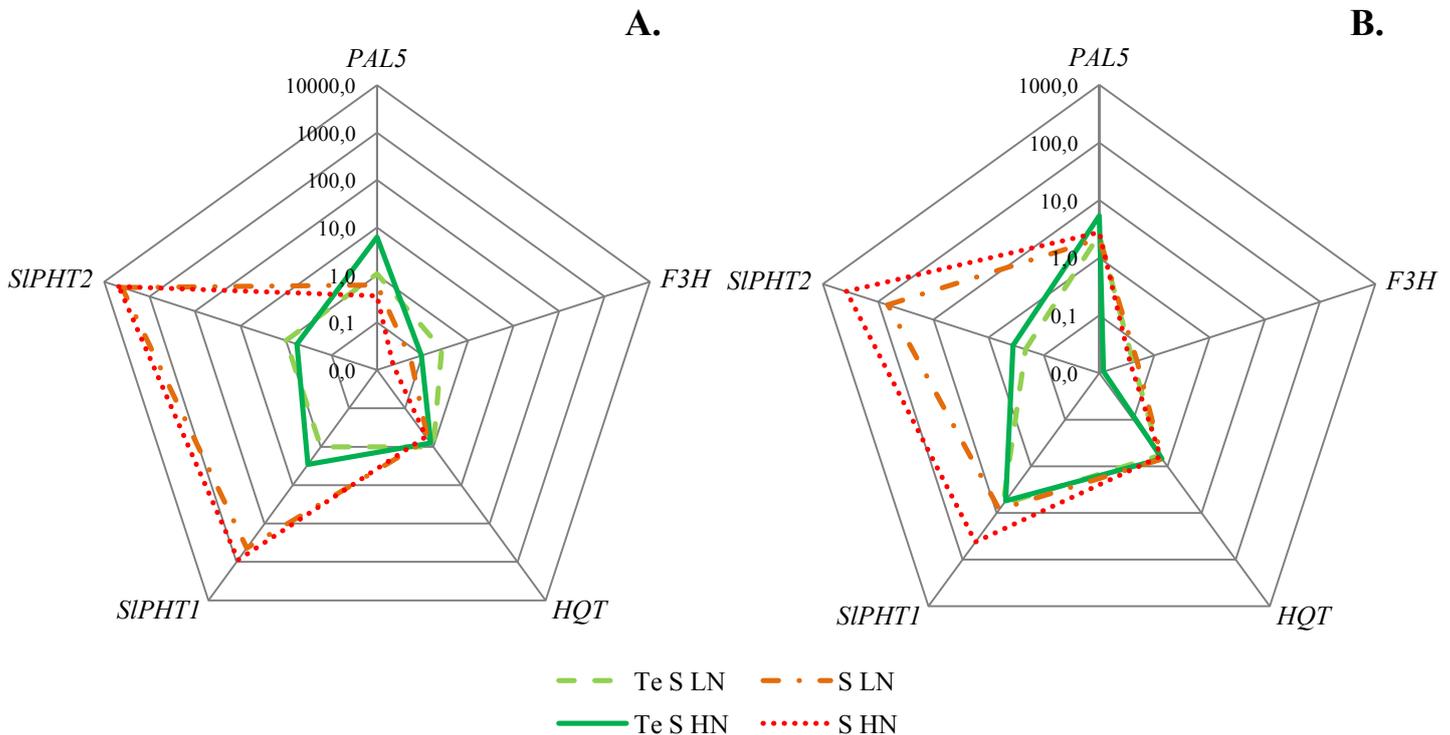


Figure 64 : Représentation radar des valeurs en quantité relative des niveaux d'expressions de gènes en coordonnée logarithmique dans la feuille inoculée, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te S LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te S HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. syringae* sous faible azote (S LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. syringae* sous fort azote (S HN : rouge-ligne pointillée) – Pour des raisons de clarté, les quantités relatives minimum et maximum ne sont pas indiquées sur la représentation, mais sont consignées en Annexe 5.

Les niveaux d'expression de *SIPHT1* et *SIPHT2* sont considérablement augmentés par l'inoculation de *P. syringae*, 24h après l'inoculation quelle que soit la fertilisation azotée (***) . *SIPHT2* est le gène le plus réactif puisque son expression augmente de 4000 à plus de 8000 fois dans les feuilles inoculées, alors que l'expression de *SIPHT1* augmente de 300 à 450 fois. L'effet de *P. syringae* sur le niveau d'expression de *SIPHT2* est toujours visible 12 jours après (***) (Figure 64). Douze jours après inoculation, l'expression de *SIPHT1* est moindre chez le traitement HN, mais reste 7.7 fois supérieure à celui dans les plants inoculés par de l'eau (***) . La forte augmentation observée du niveau d'expression de ces gènes est en

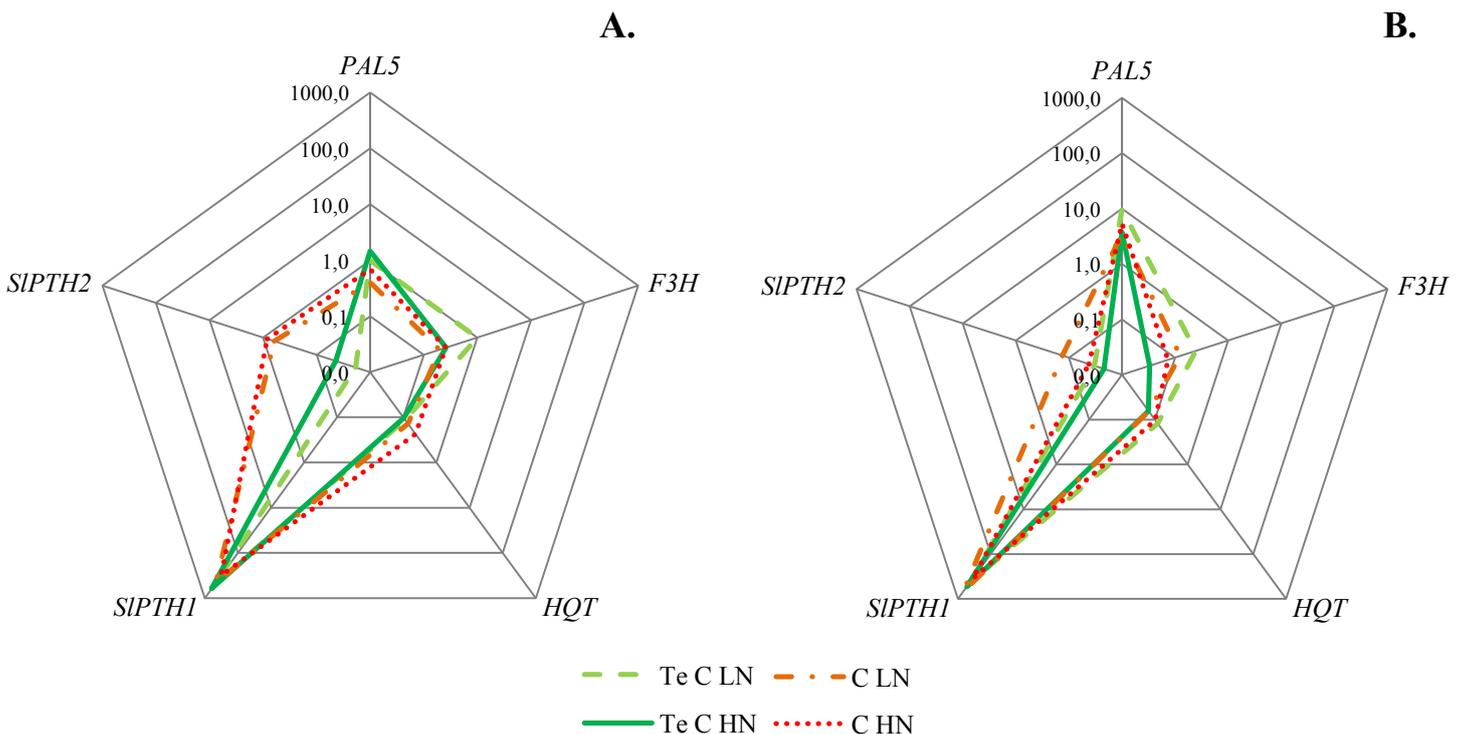
parfaite cohérence avec l'augmentation de concentration du caffeoyl putrescine dans la feuille inoculée par *P. syringae* (augmentation de 45 fois – Figure 60).

- Cas de l'infection par *P. corrugata*

L'inoculation de *P. corrugata*, conduit, 24h après inoculation, à une diminution de l'expression de *PAL5* (** - ÷ 1.75 en comparaison du témoin) sous HN, à une diminution de l'expression de *F3H* (* - ÷ 1.9 en comparaison du témoin) sous LN. Au contraire, la présence de cette bactérie conduit à une augmentation de l'expression de *HQT* (***) - x 2.3 en comparaison du témoin) chez les plants HN (Figure 65).

Douze jours après, l'effet de l'inoculation n'est plus maintenu pour *F3H* et *HQT*, alors que l'inoculation par *P. corrugata* diminue le niveau d'expression de *PAL5* sous LN (* - ÷ 2.8 en comparaison du témoin).

Vingt-quatre après inoculation, la nutrition azotée affecte seulement l'expression de *F3H*. Ainsi, l'expression de ce gène est induite sous LN chez les plantes inoculées par de l'eau (x 8.3 en comparaison du témoin HN). L'effet n'est plus observé, 12 jours après inoculation.



L'inoculation de *P. corrugata* diminue le niveau d'expression de *SIPHT1* dès 24h uniquement chez les plants HN (***) - ÷ 1.9 en comparaison du témoin). Au contraire, la bactérie augmente le niveau d'expression de *SIPHT2*, quelle que soit la disponibilité en azote (***) - x 20 à 30 en comparaison du témoin).

Douze jours après inoculation, l'inoculation de *P. corrugata* est encore visible sur les niveaux d'expression de *SIPHT1* et *SIPHT2* chez les plants LN (** et * - x 4.3 et x 1.5 en comparaison du témoin respectivement) (Figure 65).

L'infection des feuilles par *P. syringae* induit une très forte expression de *SIPHT1* et *SIPHT2* dans les 24h, qui se maintient de façon moins marquée après 12 jours d'infection. Les effets de l'infection par *P. syringae* sur les autres gènes suivis bien que significatifs sont néanmoins bien moins marqués et sont limités dans le temps. L'infection par *P. corrugata* induit des effets moins marqués que ceux de *P. syringae*.

2.3. Ratios C/N et concentrations en métabolites primaires et secondaires dans la feuille « systémique » et les tiges

2.3.a. Ratio C/N

Les ratios C/N de la feuille « systémique » et des tiges, comme nous l'observons dans la feuille inoculée, ne sont pas affectés par l'inoculation de *P. syringae*, quel que soit le moment de la récolte (Tableau 19). Par contre, une faible fertilisation azotée augmente leurs ratios C/N, quelle que soit la récolte (***) (Tableau 19). L'effet de la disponibilité en azote est plus fort sur le ratio C/N des tiges (x 2.1 à 2.7 au lieu de x 1.5 dans la feuille « systémique »).

Le ratio C/N de la feuille « systémique » est équivalent à celui de la feuille inoculée (Tableau 15) alors que celui des tiges est plus élevé quelle que soit la récolte.

		Ratio C/N de la feuille "système"		Ratio C/N des tiges	
		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
LN	Te S	13.0 (±0.75)	15.2 (±1.66)	19.2 (±2.27)	25.9 (±4.70)
	S	13.2 (±2.33)	14.4 (±3.02)	19.3 (±4.26)	20.1 (±5.14)
HN	Te S	8.9 (±0.51)	9.8 (±0.45)	7.2 (±0.59)	9.7 (±0.67)
	S	9.2 (±0.67)	9.7 (±1.66)	7.4 (±0.53)	9.4 (±0.42)

Tableau 19 : Ratio C/N de la feuille « systémique » et des tiges des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

Dans le cas de l'inoculation de *P. corrugata*, les ratios C/N de la feuille « systémique » et des tiges ne sont pas affectés, quel que soit le temps après l'inoculation (Tableau 20). Par contre, ils sont augmentés par une faible disponibilité en azote, quelle que soit la récolte (***) pour la feuille « systémique » 24h et 12 jours après et tiges 12 jours après - ** pour tiges 24h après inoculation).

Les valeurs de ratio C/N de la feuille « systémique » sont similaires à celles de l'étude de *P. syringae* (Tableau 19 et Tableau 20). Par contre, 24h après inoculation, les valeurs des ratios C/N des tiges sont plus élevées (Tableau 20) (moyenne de 38.9 par rapport à une moyenne de 13.2 pour les ratios C/N des tiges de l'étude de *P. syringae*). De plus, nous obtenons de forts écarts-types pour les traitements Te C LN et C LN du fait essentiellement d'un fort ratio C/N de certains échantillons. Douze jours après inoculation, les ratios C/N des tiges sont comparables à ceux de la feuille « systémique » (Tableau 20).

		Ratio C/N de la feuille "systémique"		Ratio C/N des tiges	
		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
LN	Te C	12.4 (±1.47)	13.5 (±1.31)	56.4 (±36.80)	15.0 (±2.36)
	C	14.1 (±2.62)	14.1 (±1.66)	84.3 (±73.62)	15.6 (±2.72)
HN	Te C	8.5 (±0.79)	9.8 (±1.15)	7.5 (±0.63)	9.0 (±1.11)
	C	8.6 (±0.35)	9.2 (±0.58)	7.3 (±0.48)	9.3 (±0.81)

Tableau 20 : Ratios C/N de la feuille « systémique » et des tiges des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

2.3.b. Concentrations en métabolites primaires et secondaires

- Cas de l'infection par *P. syringae*

Les concentrations en glucose et fructose **dans la feuille « systémique »** ne sont pas affectées par l'inoculation de *P. syringae* alors que la présence de cette bactérie diminue la concentration en saccharose, 24h après inoculation ($\div 1.2 - *$). Cet effet n'est plus visible, 12 jours après (Figure 66, Tableau 21 et Annexe 7). Comme observé dans la feuille inoculée, la concentration en amidon dans la feuille « systémique » est diminuée par l'inoculation de *P. syringae* seulement 12 jours après ($\div 1.45 - *$). Une faible disponibilité en azote augmente les concentrations en glucose (**), fructose et amidon (***), 24h après inoculation et la concentration en amidon 12 jours après (***) (Figure 66, Tableau 21 et Annexe 7).

Vingt-quatre heures après inoculation, seule la concentration en acide chlorogénique diminue en présence de *P. syringae* ($\div 1.1$ à $1.3 - *$) et 12 jours après, cette diminution est encore présente ($\div 1.75$ à $2 - ***$) (Figure 72.A et Tableau 20). A cette date, la concentration en rutine diminue, chez les plants LN infectés ($\div 1.5 *$) (Figure 66.B et Tableau 21).

Vingt-quatre heures après inoculation, les concentrations en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside (***) et tomatine (**) sont augmentées par une faible disponibilité en azote. Douze jours après inoculation, la nutrition azotée n'a plus d'effet visible sur la concentration en tomatine tandis que celle en acide chlorogénique augmente sous LN, seulement chez les plantes témoins (*) (Figure 66 et Annexe 7).

Comme dans la feuille inoculée, la concentration en caffeoyl-putrescine dans la feuille « systémique » est fortement augmentée par l'inoculation de *P. syringae*, 24h (**) et 12 jours

après (***) (Figure 66 et Tableau 21). Néanmoins, cette augmentation est plus faible (x 2 à 20) que celle observée dans la feuille inoculée (x 36 à 45).

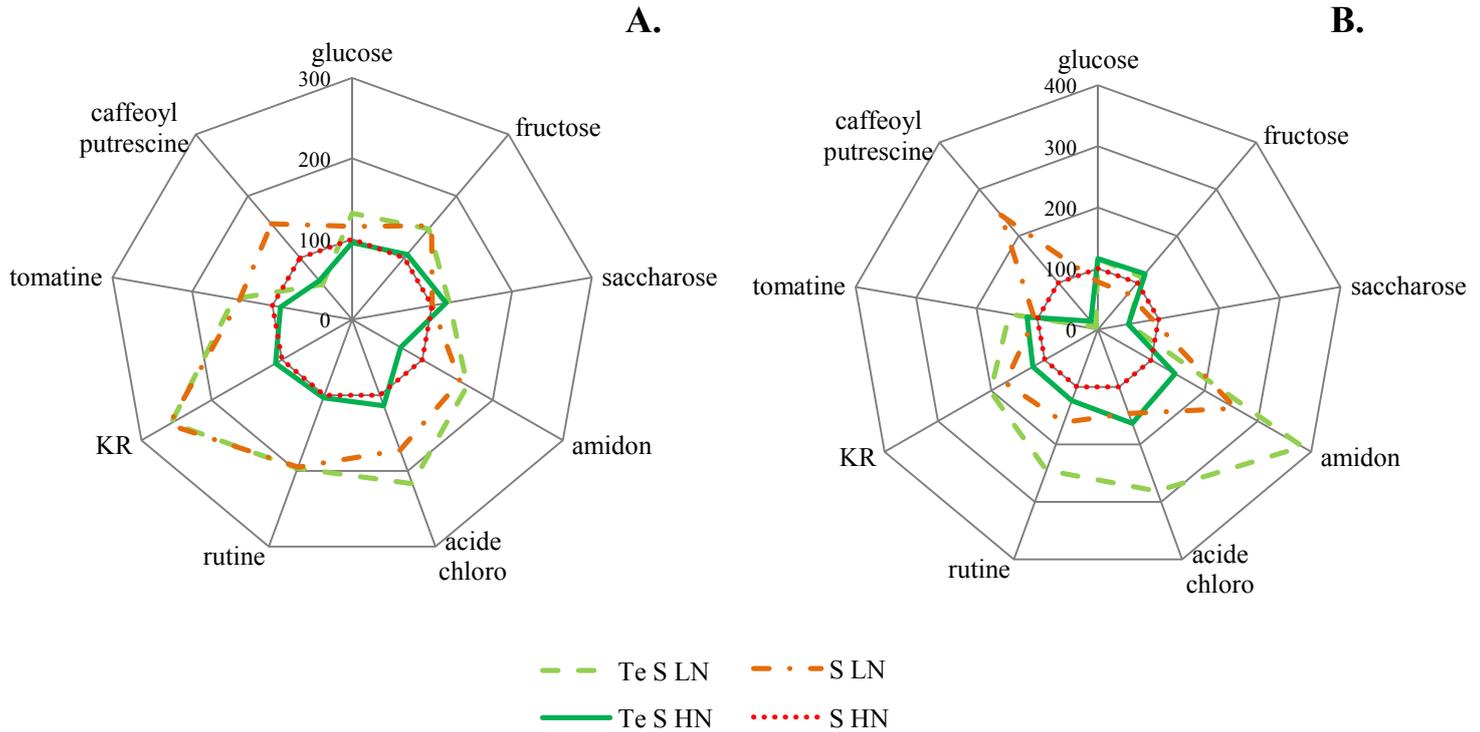


Figure 66 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de S HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside (KR), tomatine et caffeoyl putrescine dans la feuille « systémique », 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te S LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te S HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. syringae* sous faible azote (S LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. syringae* sous fort azote (S HN : rouge-ligne pointillée) – n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Saccharose		Amidon		Acide chlorogénique	
LN	Te S	6.6 (±1.30)	3.3 (±1.64)	19.8 (±4.28)	11.8 (±3.39)	0.99 (±0.102)	0.24 (±0.052)
	S	5.5 (±1.08)	6.0 (±4.43)	18.5 (±2.97)	8.0 (±6.02)	0.79 (±0.288)	0.12 (±0.030)
HN	Te S	6.4 (±0.89)	3.3 (±3.45)	8.3 (±2.05)	4.5 (±2.48)	0.52 (±0.151)	0.14 (±0.022)
	S	5.5 (±1.32)	6.6 (±4.90)	12.0 (±0.92)	3.1 (±3.46)	0.46 (±0.089)	0.08 (±0.024)
		Rutine		Caffeoyl putrescine			
LN	Te S	0.83 (±0.064)	0.45 (±0.094)	0.06 (±0.013)	0.01 (±0.004)		
	S	0.83 (±0.259)	0.30 (±0.050)	0.15 (±0.093)	0.28 (±0.173)		
HN	Te S	0.44 (±0.056)	0.23 (±0.064)	0.06 (±0.045)	0.02 (±0.017)		
	S	0.42 (±0.030)	0.18 (±0.027)	0.10 (±0.048)	0.11 (±0.096)		

Tableau 21 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine et caffeoyl-putrescine dans la feuille « systémique » des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 – Les valeurs en glucose, fructose, tomatine et kaempferol-rutinoside sont consignées en Annexe 7.

Dans les tiges, les concentrations en glucose ($\div 2.9 *$) et fructose ($\div 3.6 ***$) diminuent, 24h après l'inoculation de *P. syringae*, chez les plantes HN, alors que la concentration en saccharose n'est pas affectée (Figure 67.A et Tableau 22). Douze jours après, l'effet de l'inoculation sur les concentrations en glucose et fructose est toujours visible, et ceci, quelle que soit la fertilisation azotée ($\div 1.4$ et $\div 1.75$ à 2 respectivement - ***). Comme dans les feuilles, la concentration en amidon dans les tiges est diminuée par l'inoculation de *P. syringae* seulement 12 jours après chez les plants LN ($\div 1.1$ à 2 - **) (Figure 67 et Tableau 22).

Seule la concentration en amidon est affectée par la nutrition azotée, 24h après inoculation. Elle est augmentée (x 1.8 à 2.3) par une faible disponibilité en azote. Douze jours après, une faible disponibilité en azote augmente les concentrations en glucose (x 1.4 à 1.5 - **) et amidon (x 1.7 à 3.2 - **) et diminue les concentrations en fructose ($\div 1.4$ à 1.5 *) et saccharose ($\div 1.5$ à 1.6 *) (Figure 67, Tableau 22 et Annexe 8).

Dans les tiges, la concentration en glucose est similaire à celle de la feuille « systémique » et inoculée, 24h après inoculation. Elle augmente fortement 12 jours après. Les concentrations en fructose et saccharose augmentent elles-aussi entre 24h et 12 jours après inoculation, mais plus faiblement (Tableau 22 et Annexe 8).

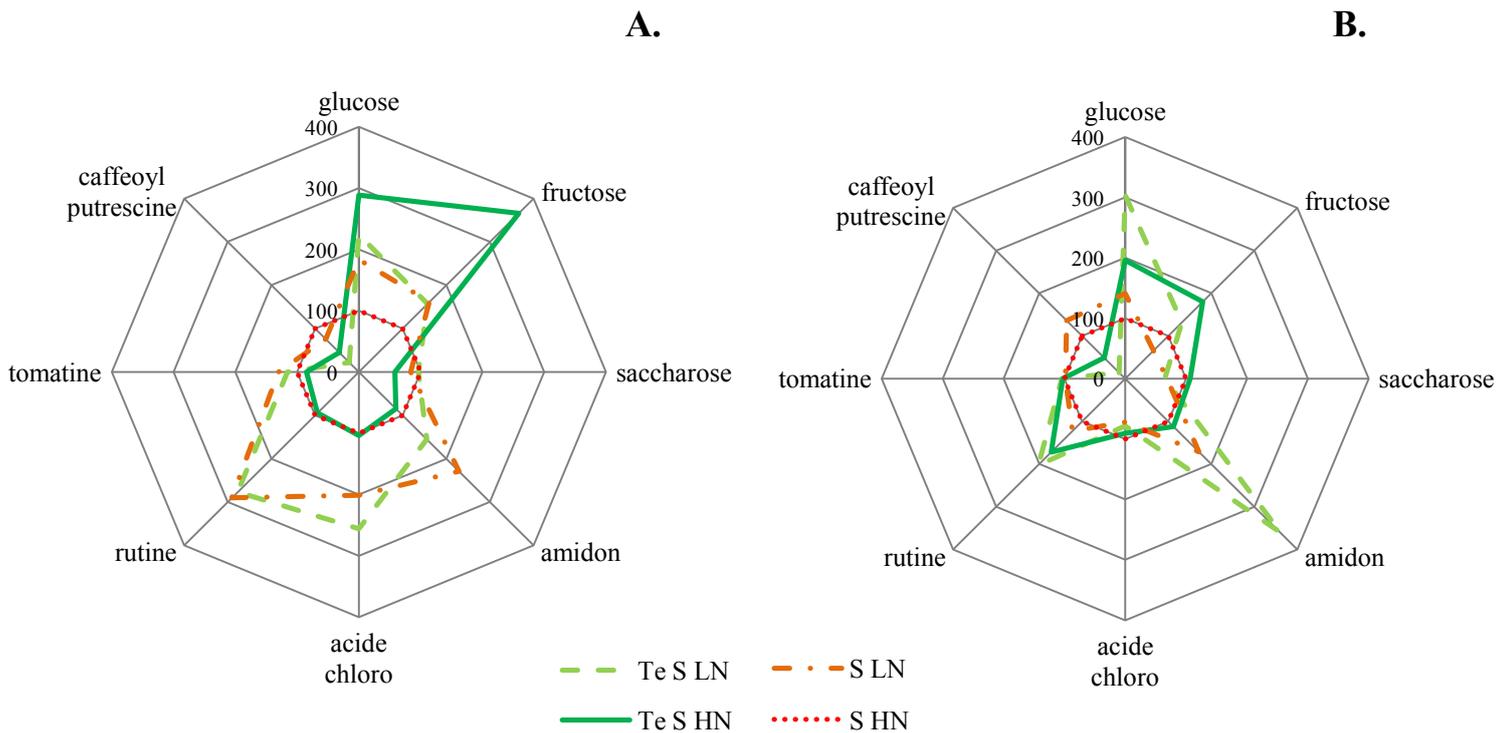


Figure 67 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de S HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, tomatine et caffeoyl-putrescine dans les tiges, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.). Les traitements sont identiques à ceux décrits en Figure 66 – n=6

Vingt-quatre heures après inoculation, seule la concentration en caffeoyl putrescine augmente en présence de *P. syringae* (x 2.2 sous HN à 3.6 sous LN ***). Douze jours après, l'inoculation conserve un effet positif sur la concentration en caffeoyl putrescine (x 2 sous HN à 9 sous LN ***) mais diminue la concentration en rutine (÷ 1.6 à 1.75 ***) (Figure 67 et Tableau 22).

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Glucose		Fructose		Amidon	
LN	Te S	8.0 (±2.40)	22.9 (±5.52)	2.8 (±0.42)	8.4 (±2.69)	1.81 (±0.922)	0.90 (±0.248)
	S	6.5 (±3.56)	10.6 (±5.70)	2.9 (±1.53)	4.2 (±1.46)	2.66 (±1.145)	0.43 (±0.233)
HN	Te S	10.3 (±4.12)	14.8 (±4.79)	6.5 (±2.24)	11.5 (±4.13)	0.99 (±0.135)	0.28 (±0.040)
	S	3.6 (±1.09)	7.5 (±2.33)	1.8 (±0.47)	6.4 (±2.27)	1.16 (±0.239)	0.25 (±0.057)
		Rutine		Caffeoyl putrescine			
LN	Te S	0.17 (±0.030)	0.16 (±0.032)	0.10 (±0.039)	0.03 (±0.013)		
	S	0.17 (±0.042)	0.10 (±0.020)	0.36 (±0.070)	0.27 (±0.112)		
HN	Te S	0.06 (±0.010)	0.14 (±0.041)	0.21 (±0.057)	0.10 (±0.038)		
	S	0.06 (±0.016)	0.08 (±0.014)	0.47 (±0.128)	0.20 (±0.061)		

Tableau 22 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en glucose, fructose, amidon, rutine et caffeoyl putrescine dans les tiges des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 - Les valeurs en saccharose, acide chlorogénique et tomatine sont consignées en Annexe 8.

Les concentrations en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine augmentent sous faible disponibilité en azote (***) - ** pour la tomatine), 24h après inoculation. A l'inverse, la concentration en caffeoyl putrescine diminue sous LN (***) (Figure 67 et Tableau 22). Cet effet n'est plus visible, 12 jours après.

- Cas de l'infection par *P. corrugata*

Les effets de l'inoculation de *P. corrugata* sur les concentrations en métabolites sont très faibles dans la feuille « systémique » et dans les tiges.

Dans la feuille « systémique », seules les concentrations en glucose et fructose augmentent en présence de *P. corrugata*, mais seulement sous HN et 24h après l'inoculation (glucose : x 1.7 ** - fructose : x 1.6 *) (Figure 68.A et Tableau 23). Douze jours après, l'effet de l'inoculation n'est plus visible (Figure 68.B et Tableau 23).

Les concentrations en glucose (*), fructose (**) et amidon (***) augmentent sous LN, 24h après inoculation. Cet effet n'est plus visible, après 12 jours d'inoculation. La concentration en saccharose n'est affectée ni par l'inoculation de *P. corrugata*, ni par la disponibilité en azote, quelle que soit la récolte (Tableau 23 et Annexe 9).

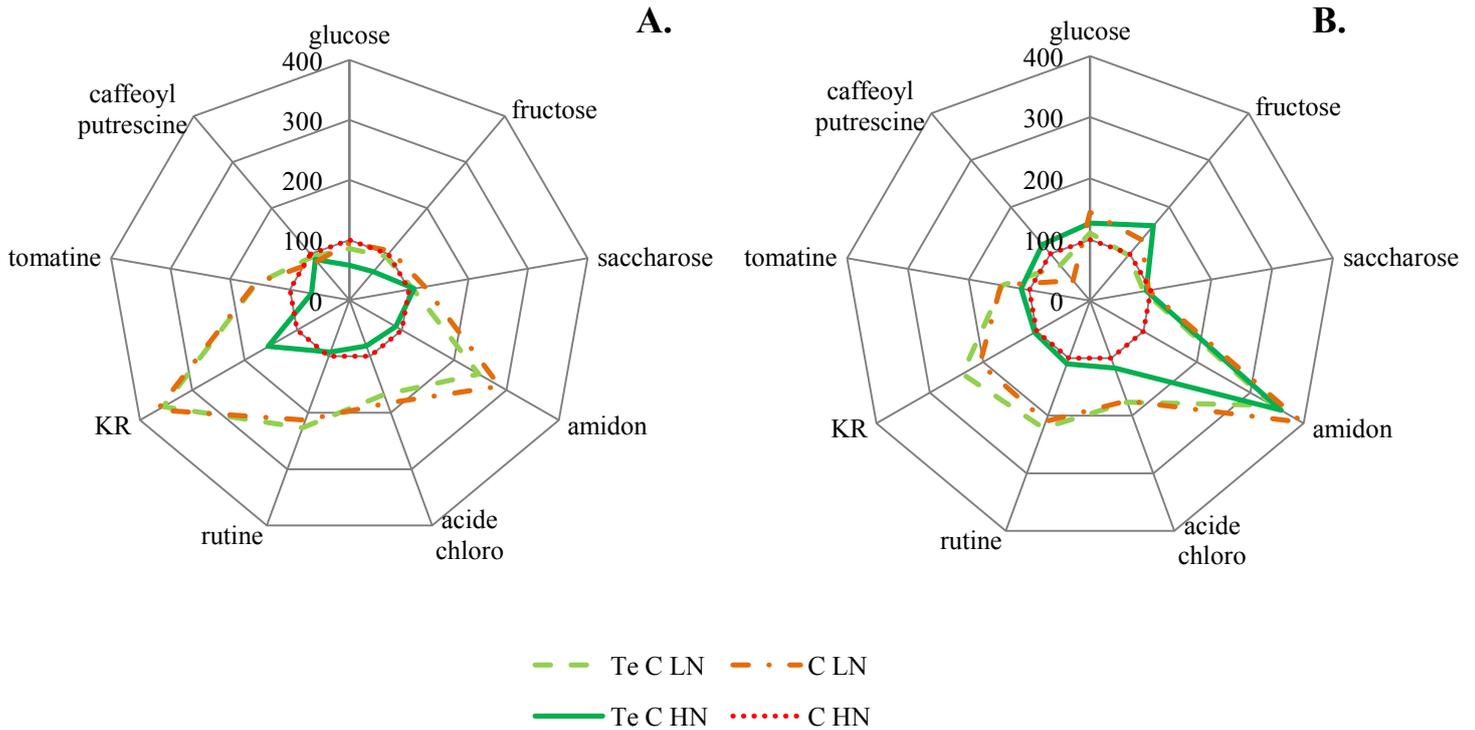


Figure 68 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de C HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside (KR), tomatine et caffeoyl putrescine dans la feuille « systémique », 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te C LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te C HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. corrugata* sous faible azote (C LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. corrugata* sous fort azote (C HN : rouge-ligne pointillée) – n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Glucose		Fructose	
LN	Te C	8.2 (±0.94)	3.9 (±1.20)	9.9 (±1.84)	3.8 (±1.04)
	C	9.1 (±1.42)	5.1 (±1.18)	11.1 (±1.39)	5.1 (±1.05)
HN	Te C	5.6 (±1.64)	4.5 (±2.17)	6.4 (±1.75)	6.2 (±3.80)
	C	9.6 (±1.03)	3.5 (±1.47)	10.5 (±1.19)	3.9 (±1.64)
		Acide chlorogénique		Caffeoyl putrescine	
LN	Te C	0.9 (±0.16)	0.18 (±0.041)	0.08 (±0.038)	0.010 (±0.0090)
	C	1.0 (±0.26)	0.17 (±0.032)	0.07 (±0.029)	0.006 (±0.0032)
HN	Te C	0.4 (±0.04)	0.12 (±0.020)	0.07 (±0.024)	0.016 (±0.0061)
	C	0.5 (±0.06)	0.10 (±0.020)	0.09 (±0.034)	0.014 (±0.0032)

Tableau 23 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en glucose, fructose, acide chlorogénique et caffeoyl putrescine dans la feuille « systémique » des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 – Les valeurs en saccharose, amidon, rutine, tomatine et kaempferol-rutinoside sont consignées en Annexe 9.

Quelle que soit la récolte, la faible disponibilité en azote augmente les concentrations en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine (24h : *** et 12 jours : *** et pour la tomatine **) dans la feuille « systémique ». Au contraire, la concentration en caffeoyl putrescine est plus faible dans les plantes LN 12 jours après inoculation seulement (*) (Figure 68.B et Tableau 23).

Dans les tiges, nous n’observons aucun effet de l’inoculation de *P. corrugata* sur les concentrations en métabolites (Figure 69, Tableau 24 et Annexe 10).

Seule la disponibilité en azote affecte les concentrations. A la première date d’observation (24h après l’inoculation), le traitement LN augmente la concentration en tomatine (***) et diminue celle en caffeoyl putrescine (*). Douze jours après inoculation, les concentrations en fructose et saccharose sont plus faibles sous LN (***) alors que celle en amidon est plus forte (***) . Les concentrations en acide chlorogénique, rutine et en tomatine sont plus élevées sous LN (***) et * pour tomatine) alors que celle en caffeoyl putrescine est plus faible (**).

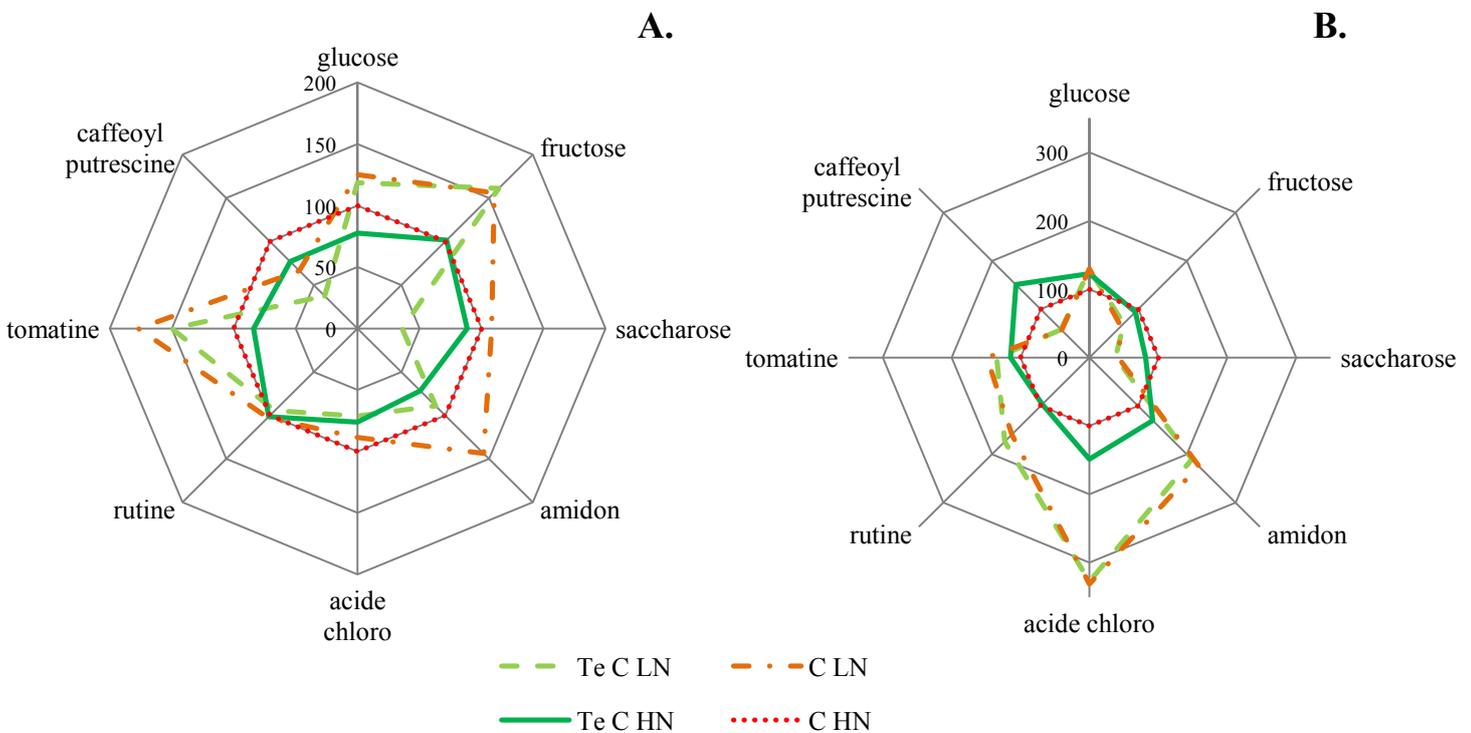


Figure 69 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de S HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, tomatine et caffeoyl putrescine dans les tiges, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.). Les traitements sont identiques à ceux décrits en Figure 68 – n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Glucose		Fructose	
LN	Te C	8.2 (± 2.39)	41.8 (± 10.52)	7.1 (± 2.98)	9.0 (± 2.15)
	C	8.7 (± 6.35)	42.1 (± 10.37)	6.9 (± 5.35)	8.2 (± 1.70)
HN	Te C	5.4 (± 2.19)	39.8 (± 17.00)	4.5 (± 1.66)	12.0 (± 2.35)
	C	6.9 (± 6.00)	32.4 (± 8.57)	4.4 (± 2.86)	12.8 (± 2.54)
		Acide chlorogénique		Caffeoyl putrescine	
LN	Te C	0.35 (± 0.110)	0.80 (± 0.275)	0.10 (± 0.056)	0.04 (± 0.026)
	C	0.43 (± 0.065)	0.81 (± 0.255)	0.17 (± 0.109)	0.04 (± 0.012)
HN	Te C	0.37 (± 0.086)	0.36 (± 0.171)	0.20 (± 0.036)	0.11 (± 0.059)
	C	0.49 (± 0.172)	0.24 (± 0.139)	0.26 (± 0.076)	0.07 (± 0.036)

Tableau 24 : Concentrations ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) en glucose, fructose, acide chlorogénique et caffeoyl putrescine dans les tiges des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (\pm écart-type) - n=6 - Les valeurs en saccharose, amidon, rutine et tomatine sont consignées en Annexe 10.

2.4. Effet de la disponibilité en azote sur l'expression des symptômes de *P. corrugata* et *P. syringae*

Sur les photographies prises, 12 jours après inoculation, nous avons mesuré, par traitement d'images (Logiciel Photoshop CS4, Adobe), la surface des nécroses dues au développement de *P. syringae* dans les feuilles et *P. corrugata* dans les tiges.

Sur les feuilles inoculées par *P. syringae*, les symptômes sont visibles dès 24h après inoculation (brunissement de la zone inoculée – Figure 70.A.B).

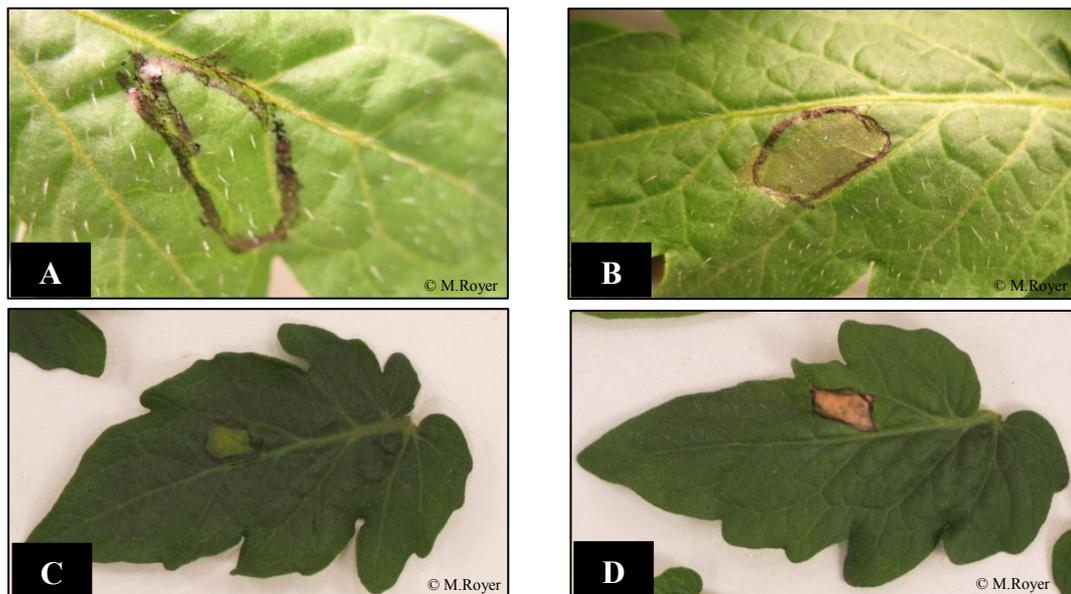


Figure 70 : Photographies d'une feuille inoculée par de l'eau 24h (A.) et 12 jours (C.) après inoculation et d'une feuille inoculée par une suspension de *P. syringae* 24h (B.) et 12 jours (D.) après inoculation

Les plages de nécroses sont plus visibles 12 jours après inoculation mais les taches que nous observons ne se sont pas développées au-delà des zones d'infiltration initialement délimitées par un trait noir (Figure 70.C.D).

La plupart des feuilles inoculées par de l'eau (Te S) ne présentent aucune nécrose sauf pour 3 d'entre-elles, sur des aires représentant moins de 0.3 cm². De ce fait, nous nous sommes intéressés uniquement à l'effet de la nutrition azotée sur le développement des symptômes sur les feuilles inoculées par la bactérie.

Nous observons que les nécroses dues à *P. syringae* ont une surface plus petite chez le traitement LN ($\div 1.4 - *$) que sous HN (Tableau 25). Toutefois, nous avons également montré précédemment (Tableau 11) que le traitement LN diminuait de 1.8 fois la surface foliaire des feuilles inoculées par la bactérie.

	LN		HN	
	Te S	S	Te S	S
Surface des nécroses sur la feuille inoculée dues à <i>P. syringae</i> (cm²)	0.07 (± 0.119)	3.01 (± 0.453)	0.01 (± 0.033)	4.29 (± 1.643)

Tableau 25 : Surfaces des nécroses (cm²) dues à l'infiltration d'eau (Te S) ou d'une suspension de *P. syringae* (S) dans la feuille inoculée de plantes poussant sous LN ou HN, mesurées 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (\pm écart-type) - n=6

Les symptômes dus à *P. corrugata* ne sont visibles qu'à l'intérieur de la tige, ils n'ont pu être mesurés qu'à la deuxième récolte, 12 jours après inoculation, sur des sections transversales de tiges. La plupart des plantes témoins (Te C) présentent une plage de nécrose provoquée par l'insertion du cône (Figure 71.A).



Figure 71 : Photographies, 12 jours après inoculation, d'une portion de tige inoculée par de l'eau (A.), par une suspension de *P. corrugata* sous LN (B.) et par une suspension de *P. corrugata* sous HN (C.)

La plupart des tiges poussant sous HN présentent une surface de nécrose supérieure à celle des tiges poussant sous LN (Figure 71.B et C) (effet azote x inoculation **). Sous LN, la surface des nécroses est 1.9 fois plus élevée que celle des plantes témoins. Sous HN, la surface des nécroses augmente de 7.8 fois entre les plantes inoculées et les plantes témoins (Tableau 26). *P. corrugata* se développe donc moins rapidement chez les plantes sous LN.

	LN		HN	
	Te C	C	Te C	C
Surface des nécroses au centre de la tige dues à <i>P. corrugata</i> (cm²)	0.15 (±0.033)	0.29 (±0.144)	0.11 (±0.065)	0.86 (±0.327)

Tableau 26 : Surfaces des nécroses (cm²) dues à l'infiltration d'eau (Te C) ou d'une suspension de *P. corrugata* (C) au centre de la tige inoculée de plantes poussant sous LN ou HN, mesurées 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

Les Figure 72 et Figure 73 résument les effets de l'inoculation des deux bactéries sur les paramètres mesurés.

l'inoculation de *P. syringae*

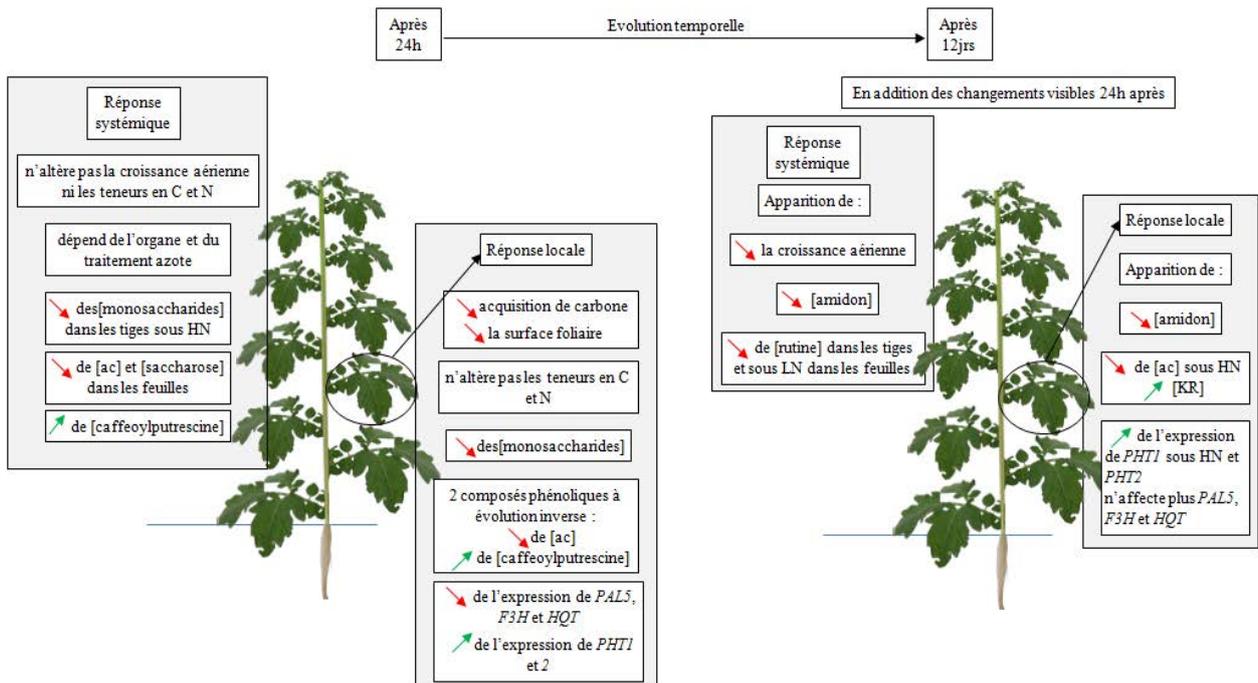


Figure 72 : Schéma de synthèse des réponses locale et systémique de la plante à l'inoculation de *P. syringae* 24h et 12 jours après inoculation – ac : acide chlorogénique – KR : kaempferol-rutinoside - monosaccharides = glucose + fructose - [x] : concentration en x

l'inoculation de *P. corrugata*

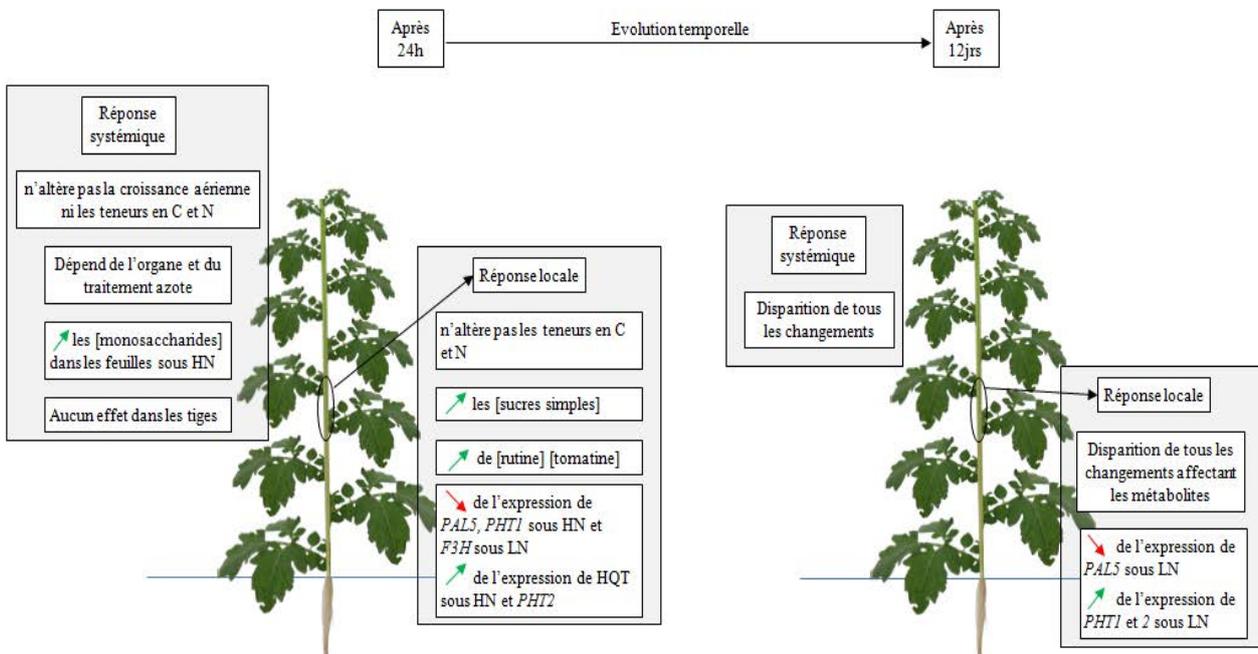


Figure 73 : Schéma de synthèse des réponses locale et systémique de la plante à l'inoculation de *P. corrugata* 24h et 12 jours après inoculation - monosaccharides = glucose + fructose - [x] : concentration en x

3. Etude d'un ravageur *Tuta absoluta*

Tuta absoluta ayant montré une variabilité dans son développement sur la feuille, nous avons établi des classes différentes de celles initiales (« présence » ou « absence » de *T. absoluta*). Des larves s'étaient déjà transformées en pupes lors de la récolte, d'autres étaient encore sous forme de larves. Lorsque la larve n'était pas retrouvée, nous avons différencié les feuilles parsemées de grandes galeries, signe que l'œuf a éclos et que la larve s'est nourrie de la feuille, des feuilles avec seulement de faibles dégâts (petites galeries) montrant que la larve est probablement morte durant les premiers stades de son développement. Ainsi, les classes utilisées sont : Témoin LN ou HN, Pupe LN ou HN, Larve LN ou HN, grandes galeries LN ou HN et petites galeries LN ou HN.

3.1. Effet de *Tuta absoluta* et de la disponibilité en azote sur les paramètres de croissance

La présence de *Tuta absoluta* n'a pas d'effet sur la biomasse sèche aérienne et sur les surfaces foliaires de la feuille inoculée et de la feuille « systémique » (Tableau 27). Seule une faible disponibilité en azote les fait diminuer (***)

		Masse sèche aérienne (g)	
		LN	HN
Développement de Tuta	Témoin (6;6)	10.2 (±1.31)	25.6 (±3.12)
	petite galerie (2;6)	10.8 (±1.70)	25.6 (±5.57)
	grande galerie (6;3)	10.3 (±2.01)	21.7 (±2.70)
	larve (13;2)	10.8 (±1.47)	24.0 (±1.14)
	pupe (8;18)	9.9 (±1.57)	27.7 (±4.14)
		Surface foliaire feuille inoculée (cm ²)	
		LN	HN
Développement de Tuta	Témoin (6;6)	125.0 (±29.78)	216.1 (±52.53)
	petite galerie (2;6)	148.0 (±0.00)	221.2 (±38.50)
	grande galerie (6;3)	122.6 (±53.25)	197.5 (±3.54)
	larve (13;2)	113.4 (±23.51)	189.0 (±8.49)
	pupe (8;18)	102.5 (±28.65)	216.8 (±45.08)
		Surface foliaire feuille "système" (cm ²)	
		LN	HN
Développement de Tuta	Témoin (6;6)	235.3 (±63.27)	284.1 (±30.53)
	petite galerie (2;6)	211.6 (±74.39)	297.5 (±31.85)
	grande galerie (6;3)	214.6 (±62.88)	320.9 (±37.55)
	larve (13;2)	185.4 (±53.56)	206.5 (±10.61)
	pupe (8;18)	245.3 (±72.84)	286.9 (±92.15)

Tableau 27 : Masses sèches aériennes (g) et surfaces foliaires (cm²) de la feuille inoculée et de la feuille « systémique » des plantes témoins, présentant des petites galeries, présentant des grandes galeries, avec une larve ou une pupa de *Tuta absoluta* poussant sous LN ou HN mesurées 16 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) – Les nombres entre parenthèse (n;n) suivant le stade de développement de Tuta représentent respectivement le nombre de plantes pour chaque traitement (nombre de plantes sous LN ; nombre de plantes sous HN)

3.2. Ratio C/N et concentrations en métabolites primaires et secondaires dans la feuille infectée

Les feuilles témoins possèdent un ratio C/N plus faible que celle présentant des galeries, une larve ou une puppe de *Tuta absoluta*, et ceci, quelle que soit la fertilisation azotée (\div 1.1 à 1.3 *). Néanmoins, nous observons une grande variabilité des valeurs.

Par ailleurs, nous observons également un effet de la disponibilité en azote (***) augmentant le ratio C/N sous LN (Tableau 28).

		Ratio C/N	
		LN	HN
Développement de Tuta	Témoin	8.9 (\pm 1.27)	6.2 (\pm 0.33)
	petites galeries	9.5 (\pm 4.78)	8.0 (\pm 0.68)
	grandes galeries	10.5 (\pm 1.32)	6.3 (\pm 0.38)
	larve	10.2 (\pm 1.67)	6.9 (\pm 0.06)
	puppe	10.7 (\pm 2.11)	7.9 (\pm 0.85)

Tableau 28 : Ratio C/N de la feuille inoculée des plantes témoins, présentant des petites galeries, présentant des grandes galeries, avec une larve ou une puppe de *Tuta absoluta* poussant sous LN ou HN mesurées 16 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (\pm écart-type) – le nombre de plantes pour chaque traitement (nombre de plantes sous LN ; nombre de plantes sous HN) est identique à celui du Tableau 27.

La présence de *Tuta absoluta* ou de ses galeries induit une augmentation des concentrations en glucose (*), fructose (**), saccharose (***) et amidon (*) (Figure 74). Les concentrations en glucose et fructose sont plus élevées dans les feuilles présentant des petites galeries ou une puppe par rapport aux feuilles témoins (Annexe 11). Pour le saccharose, les concentrations dans les feuilles avec une larve sont les plus élevées. Pour l'amidon, les feuilles avec une puppe possèdent les concentrations les plus élevées. Même si les effets sont significatifs, notons que les concentrations sont très variables (Annexe 11). Par ailleurs, nous n'observons aucun effet de la disponibilité en azote sur ces concentrations (Figure 74).

Les concentrations en métabolites secondaires ne sont pas affectées par la présence de *Tuta absoluta* (Figure 75). Par contre, les concentrations en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine sont plus élevées chez les plantes LN par rapport aux HN (***) (Figure 75 et Annexe 12).

A.

B.

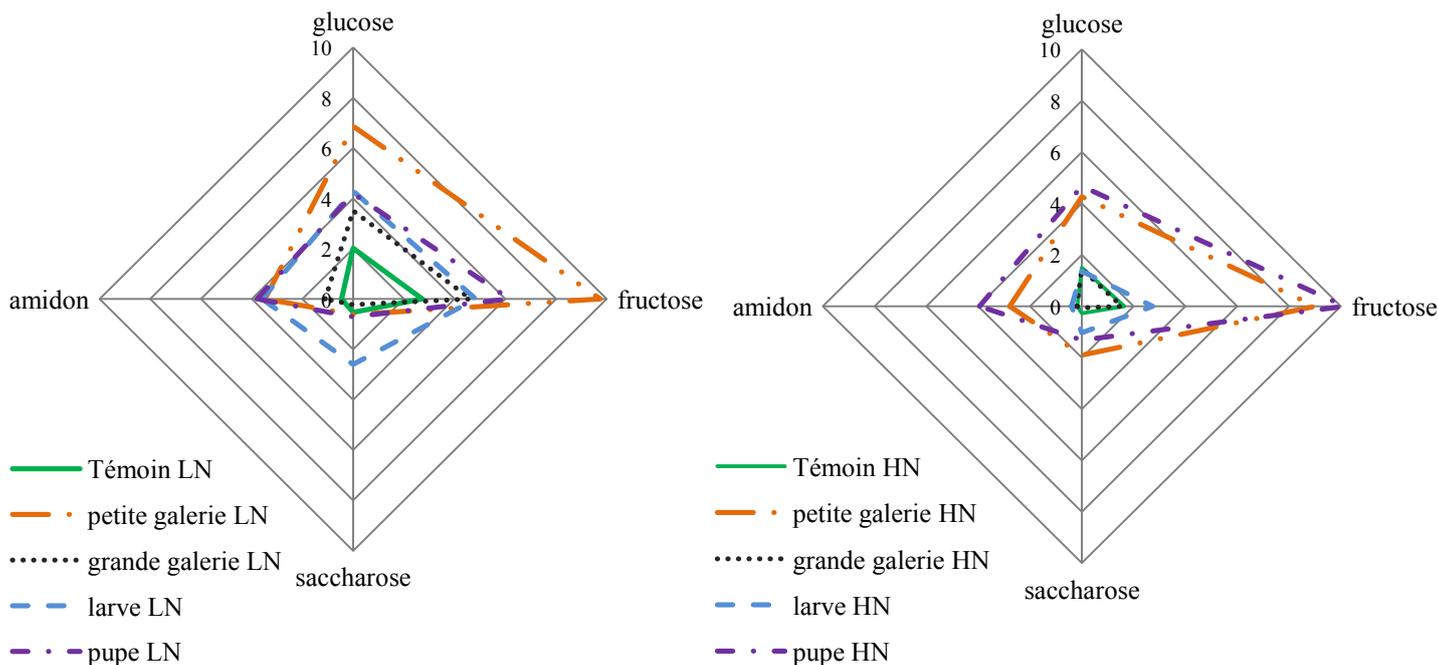


Figure 74 : Représentation radar des concentrations (mg.g⁻¹ MS) en glucose, fructose, saccharose et amidon dans la feuille témoin (vert – trait plein), présentant des petites galeries (orange – tiret deux points tiret), des grosses galeries (noir – pointillés), avec une larve (bleu – tirets) ou une pupa (violet – tiret point tiret) des plantes poussant sous une faible disponibilité en azote (LN : A.) ou une forte disponibilité en azote (HN : B.)

A.

B.

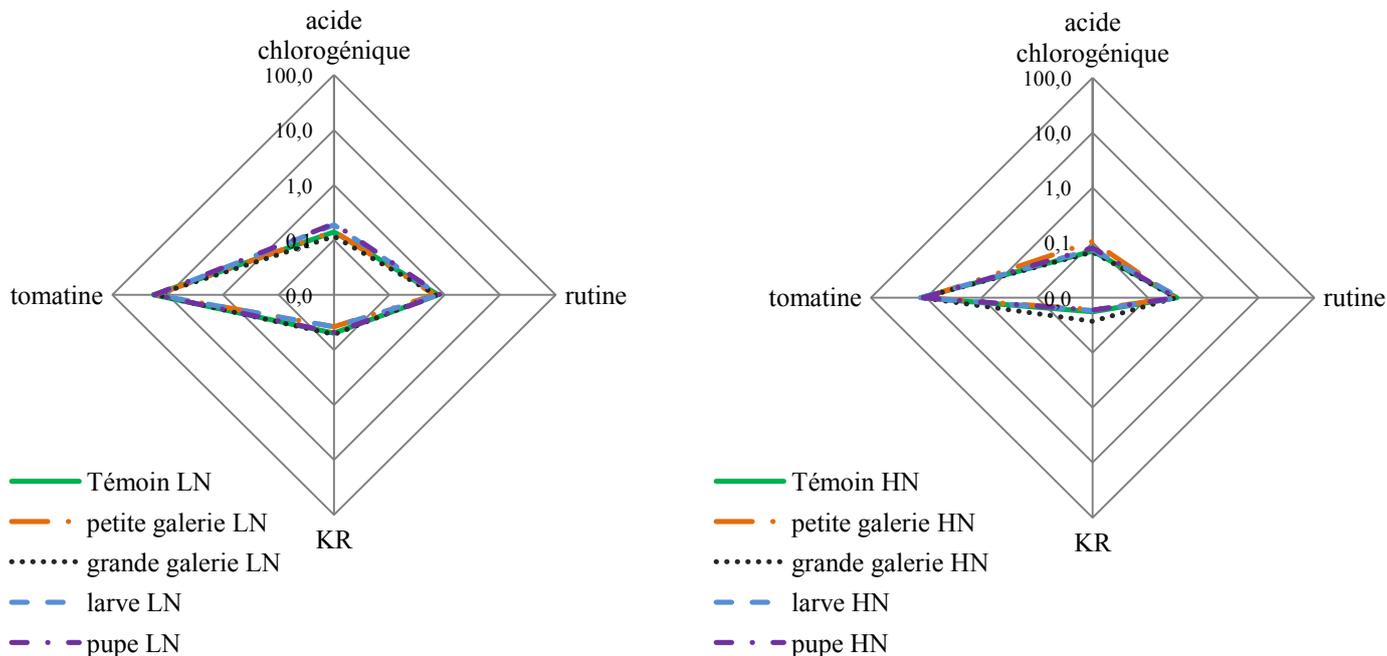


Figure 75 : Représentation radar en coordonnée logarithmique des concentrations (mg.g⁻¹ MS) en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside (KR) et tomatine dans la feuille témoin (vert – trait plein), présentant des petites galeries (orange – tiret deux points tiret), des grandes galeries (noir – pointillés), avec une larve (bleu – tirets) ou une pupa (violet – tiret point tiret) des plantes poussant sous une faible disponibilité en azote (LN : A.) ou une forte disponibilité en azote (HN : B.)

3.3. Effet de la disponibilité en azote sur *Tuta absoluta* et sur la création de galeries

Le traitement azoté n'a aucun effet sur la masse des larves et des pupes récoltées (Tableau 29). Néanmoins, le nombre de *T. absoluta* récoltées sous forme de pupe est significativement (***) plus élevé sous HN. *A contrario*, le nombre de *T. absoluta* sous forme larvaire est plus élevé sous LN (Tableau 29).

		poids de la larve ou pupe		Nombre d'individus	
		LN	HN	LN	HN
Stade de Tuta	larve	4.1 (±0.9)	2.9 (±1.8)	13	2
	pupe	4.0 (±1.3)	4.3 (±0.7)	8	17

Tableau 29 : Masses (mg) des larves et des pupes de *Tuta absoluta* et nombre d'individus sous forme larve et pupe, mesurées à la récolte, 16 jours après le dépôt des œufs sur des plantes poussant sous LN ou HN - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - Données acquises par N. Desneux (INRA Sophia-Antipolis)

Grâce à des photos prises à la récolte, nous avons pu mesurer la surface des galeries creusées par les larves. Pour des raisons matérielles, nos résultats sont incomplets car certaines des feuilles infectées ont servi de support et d'alimentation pour suivre le développement des larves après la récolte et il n'a pas été possible de photographier ces galeries de façon satisfaisante. Cela explique que des classes ont un nombre d'échantillons plus faible que précédemment.

		Surface des galeries	
		LN	HN
Développement de Tuta	petite galerie (2;6)	0.04 (±0.008)	0.07 (±0.029)
	grande galerie (5;3)	0.69 (±0.107)	1.36 (±0.334)
	larve (5;0)	1.10 (±0.888)	/
	pupe (8;18)	0.84 (±0.492)	1.41 (±0.605)

Tableau 30 : Surfaces (cm²) des galeries créées par les larves de *Tuta absoluta* mesurées à la récolte, 16 jours après le dépôt des œufs sur des plantes poussant sous LN ou HN - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) – Les nombres entre parenthèse (n;n) suivant le stade de développement de *T. absoluta* représentent respectivement le nombre de plantes pour chaque traitement (nombre de plantes sous LN ; nombre de plantes sous HN).

Nous observons un effet du stade de développement de *T. absoluta* (***) sur la surface des galeries (Tableau 30). La surface de galeries plus faible pour la catégorie « petite galerie » nous indique que ces larves, absentes à la récolte, sont probablement mortes dès leurs premiers stades de développement car elles n'ont pas pu creuser un nombre important de galeries. De plus, nous n'observons pas d'effet de la disponibilité en azote sur les surfaces de galeries (Tableau 30). Les larves ont détruit la même surface de feuilles, quelle que soit la fertilisation azotée de la plante. Cette observation conforte le fait que leurs masses étaient similaires, quel que soit le traitement azoté appliqué.

4. Discussion

4.1. *La réponse des plantes aux traitements azotés, similaire pour les trois études, est cohérente avec les résultats de notre étude en serre et avec la littérature*

La limitation en azote appliquée a réduit significativement la production de biomasse sèche et la surface foliaire des plantes. De façon identique à la première expérimentation (partie 1 des Résultats), le ratio C/N est plus fort lorsque N est limité. L'écart entre les ratios des traitements LN et HN est plus grand pour les tiges, comme le montrent Matros *et al.* (2006). Les concentrations en glucose, fructose et amidon suivent l'augmentation du ratio C/N sous LN, ce que nous montrons également dans la première étude (Royer *et al.*, 2013). Nous retrouvons une augmentation des concentrations en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine avec le traitement LN, ce qui est cohérent avec la littérature (Hoffland *et al.*, 1999; 2000a; Ibrahim *et al.*, 2011; Royer *et al.*, 2013).

4.2. *L'inoculation des bactéries pathogènes étudiées (*P. syringae* et *P. corrugata*) modifie le métabolisme des glucides dans les heures qui suivent l'infection*

Les bactéries *P. syringae* et *P. corrugata*, par leur présence, modifient le métabolisme des glucides avec 2 réponses contrastées :

Nous observons une forte diminution des concentrations en glucose et fructose 24h et 12 jours après l'infection par *P. syringae*. Ce résultat est également observé par Berger *et al.* (2004) chez la tomate infectée par *B. cinerea*. Une différence majeure concerne le saccharose dont la concentration évolue comme le glucose et le fructose lors de l'attaque de *B. cinerea* (Berger *et al.*, 2004) alors que *P. syringae* n'a pas d'effet. L'infection par un pathogène induit des réactions de défense de la plante mais aussi des modifications dans le métabolisme glucidique (Berger *et al.*, 2004; 2007). La diminution des concentrations en glucides en est une indication typique. Ces sucres simples sont utilisés dans la production d'énergie et comme précurseurs dans la biosynthèse de métabolites secondaires de défense (López-Gresa *et al.*, 2010). Ils peuvent aussi être détournés par le pathogène pour son propre développement, créant un nouveau puits de ressources pour la plante (Berger *et al.*, 2004). Cette altération du métabolisme des glucides peut être considérée comme une conséquence d'une diminution de l'acquisition de carbone dans les feuilles. Nous avons montré que le taux d'assimilation nette de CO₂ diminue et que le taux de respiration augmente dans la feuille inoculée, 24h après l'infection de *P. syringae*. Ce résultat est cohérent avec ce qui a été trouvé sur *Arabidopsis thaliana* infecté par la même souche de *P. syringae*. L'action du pathogène porte sur les mécanismes de la photosynthèse, l'expression de gènes et sur l'altération des tissus photosynthétiques. Le rendement du photosystème II du site d'infection est plus faible (Bonfig *et al.*, 2006), la respiration plus forte et l'expression du gène photosynthétique *RbcS* diminuée (Berger *et al.*, 2004). Les tissus foliaires infectés sont manifestement nécrosés, ce qui entraîne une diminution de l'acquisition de carbone.

La concentration en amidon chute en présence de *P. syringae* entre 24h et 12 jours après l'inoculation. C'est aussi le cas pour la tomate attaquée par *B. cinerea* (Berger *et al.*, 2004) où la concentration en amidon diminue significativement 3 jours après l'inoculation. L'altération

de sa concentration, décalée dans le temps, est une conséquence de la perturbation du métabolisme des glucides simples, précurseurs de l'amidon.

Néanmoins, la diminution de concentrations des glucides induite par une attaque de pathogène n'est pas universelle. En effet, alors que l'acquisition de carbone dans les feuilles n'est pas affectée, les concentrations en glucides solubles augmentent après l'infection de *P. corrugata*. Ici, le saccharose suit l'évolution du glucose et fructose et voit sa concentration également augmenter. A notre connaissance, aucune étude explicite comment évoluent les concentrations en composés primaires et secondaires de la plante à l'infection de *P. corrugata*. Ce pathogène pénètre dans la plante hôte au niveau de la tige, du collet ou des racines (Catara, 2007). Il ne crée donc pas de plages de nécrose sur les feuilles, ni de réponse systémique de la photosynthèse. Ainsi, les échanges gazeux foliaires ne sont pas affectés. Néanmoins, l'intérieur des tiges infectées est nécrosé. Le transport dans les tissus conducteurs peut en être altéré, d'où une accumulation des glucides simples et surtout du saccharose, forme habituelle de transport des sucres, près de la zone d'infection. Enfin, *P. corrugata* est caractérisé par une grande versatilité métabolique lui permettant d'utiliser de nombreux substrats comme seule source de carbone (Catara, 2007). Cela pourrait expliquer pourquoi sa présence n'affecte que très peu les concentrations en glucides simples étudiés dans la zone inoculée. Dans de nombreux pathosystèmes, le pathogène provoque une augmentation des concentrations en sucres. C'est le cas du virus Y de la pomme de terre chez le tabac, de l'oïdium chez le blé ou d'*Albugo candida* chez *Arabidopsis thaliana* (Berger *et al.*, 2004).

4.3. *P. syringae* élicite la synthèse de caffeoyl putrescine, reliée à une forte induction de l'expression des gènes *SLPHT 1 et 2*

Le caffeoyl putrescine, de la famille des phénolamides est élicité par *P. syringae* dès les premières heures après l'infection. Une élicitation de ce composé a déjà été observée dans les premières heures après l'inoculation de *P. syringae* dans une culture de cellule de tabac (Baker *et al.*, 2005). Nous retrouvons une concentration basale dans les plantes témoins, prouvant le rôle de phytoanticipine de cette molécule, comme le montrent Keller *et al.* (1996) dans des cultures de cellule de pomme de terre inoculées par *Phytophthora infestans*. Les phénolamides sont décrits comme composés bioactifs avec des activités antivirale, antibactérienne, antifongique et répulsive. Ils font partie des composés de défense de la plante induits lors de l'attaque de bioagresseurs (Bassard *et al.*, 2010). Entre autres, ils peuvent se lier aux parois cellulaires pour les renforcer (Facchini *et al.*, 2002).

Le caffeoyl putrescine appartient à la même famille que le *p*-coumaroyldopamine et le feruloyldopamine dont l'induction par cette même bactérie a déjà été démontrée chez la tomate (Zacarès *et al.*, 2007). Dans notre étude, l'élicitation se propage hors de la zone inoculée, indiquant une réponse systémique de la plante agressée. Or, Zacarès *et al.* (2007) observent, sur une autre variété de tomate (Rutgers) que l'augmentation est locale. Ils observent des évolutions temporelles contrastées selon les métabolites. En effet, la concentration en *p*-coumaroyldopamine reste élevée jusqu'à 72h après inoculation alors que celle en feruloyldopamine diminue dès 24h après. Dans notre cas, le caffeoyl putrescine suit l'évolution du *p*-coumaroyldopamine puisque nous le retrouvons encore en forte concentration 12 jours après inoculation.

Le choix de la variété a probablement des conséquences dans ces réponses. Nous avons utilisé la variété Better Bush alors que Zacarés *et al.* (2007) ont utilisé Rutgers. L'inoculation de *P. syringae* chez la variété Rio Grande élicite un autre phénolamide : le *p*-coumaroylnoradrenaline (Von Roepenack-Lahaye *et al.*, 2003). La spécificité de la réponse de l'espèce de tomate semble donc être liée à son génotype.

4.4. *P. syringae* induit un changement dans la répartition des ressources au sein de la voie des phénylpropanoïdes

En croisant les résultats des concentrations en métabolites et les inductions d'expression des gènes, nous observons plusieurs relations cohérentes. La concentration en acide chlorogénique diminue et celle en rutine reste stable dans les heures qui suivent l'inoculation ; ce qui peut être relié à la répression rapide de l'expression de *PAL5* après l'inoculation. Le flux de carbone entrant dans la voie des phénylpropanoïdes est plus faible, ce qui implique la diminution des concentrations en composés et la répression des expressions de gènes en aval de cette voie de biosynthèse. En effet, nous observons une diminution du niveau de l'expression de *HQT* et *F3H*. La répression de l'expression du gène *HQT* est en parfaite cohérence avec la diminution de la concentration en acide chlorogénique. Au contraire, la concentration en caffeoyl putrescine augmente après l'inoculation. Ce résultat est en parfaite cohérence avec la forte induction de l'expression des deux gènes putatifs *SIPHT1* et *2*, codant pour la putrescine hydroxycinnamoyl transférase impliquée dans la synthèse du caffeoyl putrescine. L'augmentation de la concentration en caffeoyl putrescine est toujours visible 12 jours après l'inoculation, ainsi que l'induction de l'expression des deux gènes correspondants, même si l'augmentation est plus faible. Il est probable que le carbone soit détourné vers la synthèse de caffeoyl putrescine au détriment de celle en acide chlorogénique. Néanmoins, l'induction de la synthèse de caffeoyl putrescine est beaucoup plus forte et durable dans le temps. Le détournement du carbone issu de la phénylalanine vers la synthèse de ce composé ne suffit pas, seul, à expliquer cette forte induction (Figure 76).

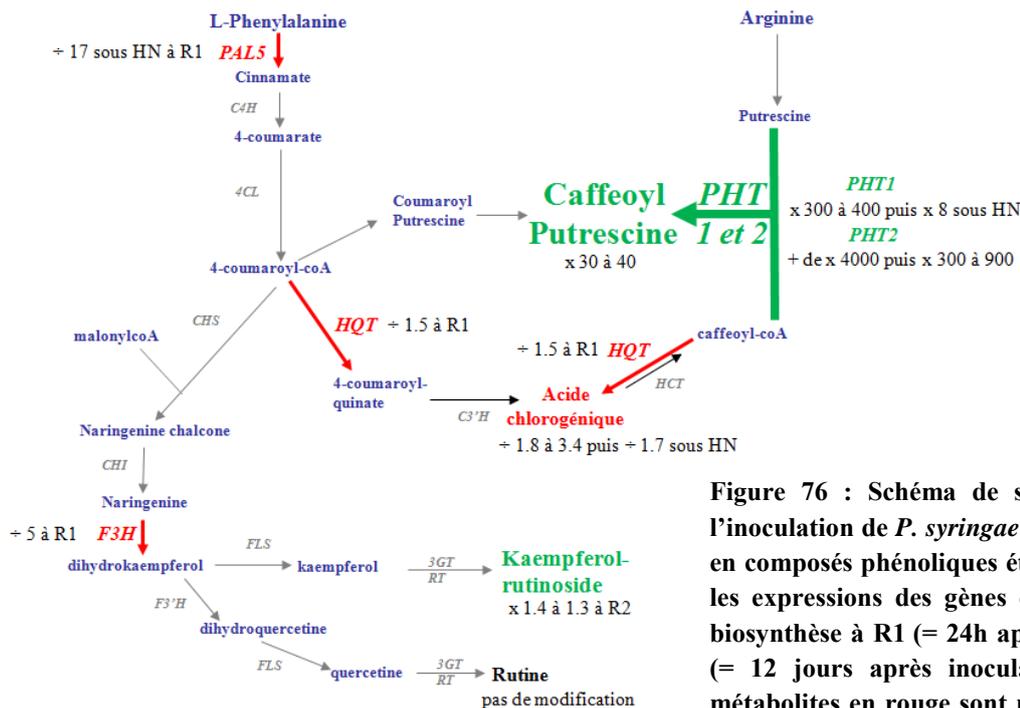


Figure 76 : Schéma de synthèse de l'effet de l'inoculation de *P. syringae* sur les concentrations en composés phénoliques étudiés en relation avec les expressions des gènes clés de leurs voies de biosynthèse à R1 (= 24h après inoculation) et R2 (= 12 jours après inoculation) – les gènes et métabolites en rouge sont réprimés, ceux en vert sont induits

4.5. *L'herbivorie par T. absoluta induit une faible réponse de la plante dans nos conditions expérimentales*

L'herbivorie causée par la larve de *T. absoluta* a induit une faible réponse chimique de la plante, que ce soit sur les métabolites primaires (dont la concentration augmente légèrement en présence de *T. absoluta*) ou secondaires. Le fait que certains individus se soient déjà transformés en pupes et que certaines larves n'ont pu être retrouvées lors de la récolte a réduit le nombre d'individus par classe et a augmenté la variabilité. En l'absence de références bibliographiques, le délai de réponse de la tomate à l'attaque de *T. absoluta* n'est pas connu ; on peut penser que la réponse de la plante se mette plus rapidement en place qu'escompté lors de l'herbivorie par la larve. Comme certaines larves étaient déjà en pupation lors de la récolte, la feuille n'étant plus consommée, il est possible que la réponse ne soit plus visible 16 jours après le dépôt de l'œuf.

La plupart des études sur le pathosystème *T. absoluta*/tomate s'intéressent aux composés organiques volatils ou aux sucres acylés. Trois types de composés, sécrétés par les trichomes glandulaires, sont associés à la résistance à *Tuta absoluta* : les sucres acylés et deux terpènes, le zingibérène et le 2-tridécanone (de Resende *et al.*, 2006; Maluf *et al.*, 2010). Du fait de l'absence d'étude sur les composés phénoliques et les glycoalcaloïdes et la résistance à *T. absoluta*, on peut penser que ces métabolites sont plus faiblement impliqués dans la résistance à cet insecte. Néanmoins, Rasmy *et al.* (1985) ont montré que des feuilles de tomate sauvage, dont les trichomes étaient retirés, étaient toujours résistantes aux tétranyques ; ce qui prouve que d'autres mécanismes rentrent en jeu dans la défense de la plante vis-à-vis des insectes.

Un seul œuf sur une foliole n'est peut être pas suffisant pour induire une réponse significative de la plante. Il est nécessaire d'augmenter le nombre d'œufs déposés, ou d'augmenter le nombre de feuille affectée par plante. De plus, le nombre de plante par classe est trop faible pour obtenir des différences entre traitements hautement significatives statistiquement.

4.6. *Botrytis cinerea ne s'est pas développé de manière satisfaisante dans nos conditions expérimentales*

Botrytis cinerea ne s'est pas montré suffisamment agressif dans nos conditions expérimentales (phytotrons) : un très faible nombre de plantes (6/48) ont développé un chancre sur la tige (seul critère probant du développement du champignon dans l'hôte). Nous avons plusieurs hypothèses pour expliquer ce fait. Nous avons d'abord incriminé la faible humidité dans les phytotrons. Néanmoins, lors de la seconde expérimentation, bien que l'humidité relative soit fortement augmentée, à un niveau compris entre 90% et la saturation (selon les périodes jour/nuit), les infections n'ont pas mieux réussi. La deuxième hypothèse est liée au fait que *B. cinerea* est un pathogène de faiblesse. La plupart des études en phytopathologie utilisent des plantes en pot transportées dans un environnement confiné pour l'inoculation. Ce transport induit un stress qui altère la croissance des plantes, les affaiblissant et les rendant plus susceptibles aux attaques parasitaires. Notre troisième hypothèse développe l'idée que les plantes limitées *versus* carencées en azote n'ont pas la même susceptibilité aux attaques. Dans nos conditions expérimentales, nous avons cultivé les plantes en système hydroponique piloté par un automate régulant de façon très régulière la concentration en nitrate de la solution nutritive. Ce système permet de produire des plantes limitées en N tout

au long de la culture, mais jamais carencées. Cela n'est pas le cas dans les études qui utilisent des cultures en pots avec un arrosage manuel qui apporte des petites doses d'engrais à intervalles de temps variables. Selon leur vitesse de croissance, les plantes peuvent se trouver, entre deux arrosages, totalement privées d'azote ou d'autres nutriments et cette carence temporaire peut les rendre plus sensibles à l'attaque de pathogènes de faiblesse, comme *B. cinerea*. Enfin, les études ayant montré de bons taux de réussite de l'inoculation de ce champignon chez la tomate (Lecompte *et al.*, 2010) utilisaient des plantes plus âgées (50 jours après semis contre moins de 30 jours dans notre étude) dont la vitesse de croissance était nécessairement plus faible. Ces plantes plus âgées en phytotron forment aussi un couvert végétal qui favorise un climat saturant en eau autour de la blessure, pour un développement optimal de *B. cinerea*. Malgré le taux de 90% d'humidité obtenu dans les phytotrons lors de notre deuxième expérimentation, l'environnement proche du chicot n'était probablement pas assez saturé en eau.

Cependant, 5 des 6 plantes infectées par *B. cinerea* poussaient sous une faible disponibilité en azote et elles étaient inoculées par la souche la plus virulente BC1. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la bibliographie (Lecompte *et al.*, 2010; Hoffland *et al.*, 1999).

4.7. Le comportement du bioagresseur aux traitements azotés et la réponse du plant de tomate sont spécifiques du bioagresseur

P. syringae, *P. corrugata* et *T. absoluta* sont favorisés par une disponibilité élevée en azote. La surface des symptômes causés par *P. syringae* est réduite sur les feuilles sous faible disponibilité en azote. Hoffland *et al.* (2000b) observent également que les feuilles de tomates poussant sous forte disponibilité en azote montrent des symptômes plus sévères. Néanmoins, l'augmentation des surfaces de symptômes semble être plus liée à l'augmentation de la surface des feuilles avec la disponibilité en azote.

Nous observons que *P. corrugata* est favorisé sous forte disponibilité en azote. Ce qui est cohérent avec d'anciennes études affirmant qu'un niveau élevé d'azote dans le sol mène à une végétation plus tendre et favorise donc l'infection de *P. corrugata* (Catara, 2007; Jones *et al.*, 1982).

Les larves de *T. absoluta* se développent plus lentement sur les plantes limitées en N. L'herbivorie sous faible disponibilité en N leur est donc moins bénéfique. Leite *et al.* (1997) observe également que l'augmentation des concentrations en N des feuilles de tomate en serre est liée à une réduction de la mortalité des larves de *T. absoluta* et à une augmentation du poids des pupes et de l'éclosion des œufs. Les concentrations en sucres ne sont pas affectées. Nous faisons donc l'hypothèse que les métabolites secondaires, tels que l'acide chlorogénique, la rutine ou la tomatine dont les concentrations augmentent, sont impliqués dans la limitation de l'infection. D'autres composés non déterminés dans notre étude peuvent également avoir un rôle. Une faible disponibilité en azote s'accompagne d'une concentration en protéines solubles plus basse dans les feuilles de tomate (Hoffland *et al.*, 2000a). La faible teneur en protéines des feuilles peut être aussi liée au faible taux de développement des larves de *T. absoluta*. De plus, Mihaliak et Lincoln (1985) ont montré que les concentrations en monoterpènes et sesquiterpènes (COV) augmentent sous limitation en N. Ces métabolites sont impliqués dans la résistance de la plante à *T. absoluta* (de Resende *et al.*, 2006). Ces fortes concentrations pourraient être liées au ralentissement de développement des larves.

Néanmoins, d'autres études (Letourneau *et al.*, 1996; Leite *et al.*, 2004) ne montrent aucun effet de la concentration foliaire en azote sur la sévérité de l'attaque de *T. absoluta*.

Malgré le faible nombre de plantes inoculées, nos résultats évoquant un développement de *B. cinerea* favorisé sous faible disponibilité en azote est cohérent avec les résultats obtenus par Hoffland *et al.* (1999) et Lecompte *et al.* (2010). Ainsi, le comportement du bioagresseur vis-à-vis de la disponibilité en azote de la plante hôte est dépendant du bioagresseur. Ce qui est cohérent avec les observations de Solomon *et al.* (2003) sur la réponse différentielle de divers champignons à l'application de fertilisants ou avec la revue plus généraliste de Huber et Thompson (2007). Le fait que le comportement de *Botrytis cinerea* s'oppose à celui d'autres bioagresseurs est probablement lié à sa nature de pathogène de faiblesse. De plus, il est connu que *Botrytis cinerea* possède une enzyme permettant de détoxifier la tomatine, composé de défense présent chez la tomate (Quidde *et al.*, 1998). Cela pourrait expliquer pourquoi il est favorisé sous faible disponibilité en azote, où les concentrations en tomatine sont élevées dans la plante.

Dans nos essais, la production de caffeoyl putrescine augmente après l'inoculation de *P. syringae* alors que celle de *P. corrugata* ne modifie en aucun cas la concentration en ce métabolite. De plus, alors que l'inoculation de *P. syringae* diminue fortement les concentrations en glucides simples, la présence de *P. corrugata* a un effet inverse, les faisant augmenter 24 h après inoculation. Ainsi, deux espèces bactériennes appartenant au même genre induisent des changements différents dans les métabolismes primaire et secondaire. Cela montre que la réponse de la plante est spécifique du pathogène étudié. Cela peut être dû à son mode d'action et/ou au lieu de l'infection. Ici, *P. corrugata* est inoculé dans une portion de tige alors que *P. syringae* est infiltré dans la face inférieure d'une feuille.

A partir du nombre croissant de publications sur l'effet de la disponibilité en azote sur le comportement des bioagresseurs, certains auteurs ont suggéré la règle générale suivante : le développement des pathogènes biotrophes est favorisé par une nutrition riche en azote alors que les pathogènes nécrotrophes sont défavorisés par ce type de nutrition (Solomon *et al.*, 2003; Lecompte *et al.*, 2010). Néanmoins, comme nous l'avons vu, il est difficile de concevoir l'application d'une règle unique, que ce soit pour le comportement du bioagresseur ou pour la réponse de la plante. Par exemple, Hoffland *et al.* (2000b) ont montré que seulement certains paramètres de l'infection de la tomate par *Oidium lycopersicum* étaient affectés par la fertilisation azotée. Ainsi, ils ont observé que le pourcentage de surface foliaire colonisée par le champignon n'était pas affecté par la disponibilité en azote, alors que le nombre de spores produites par volume d'inoculum était supérieur sous forte disponibilité en azote.

5. Conclusions

La réponse de la plante est spécifique au bioagresseur. Tandis que *P. syringae* induit une diminution marquée des concentrations en sucres solubles, *P. corrugata* induit leur augmentation. Les métabolites primaires et secondaires sont affectés plus ou moins fortement selon le bioagresseur, alors que le ratio C/N reste inchangé, suggérant une modification de répartition des ressources entre les métabolismes plutôt qu'une limitation de leur quantité.

Selon son intensité, la réponse se maintient dans le temps pour *P. syringae*. Pour *P. corrugata*, où la réponse est moindre, les modifications sont plus faibles, voire inexistantes 12 jours après inoculation. Certains changements dans les concentrations en métabolites sont apparus dans les organes distants 12 jours après inoculation seulement, montrant une propagation de la réponse à l'ensemble des parties aériennes, et donc une réponse systémique qui s'installe au cours du temps. La réponse dans les organes plus éloignés est, pour la plupart des cas, moins forte.

Le caffeoyl-putrescine est fortement induit par *P. syringae*. La famille des phénolamides, d'où provient ce métabolite, regroupe des métabolites de défense antibactériens et antifongiques. Ce composé est retrouvé dans les plantes saines. Il peut être considéré comme phytoanticipine.

Nous avons montré que la disponibilité en azote pour la plante influence le développement du bioagresseur étudié. La surface des symptômes de *P. corrugata* et *P. syringae* est moins étendue lorsque les plantes sont limitées en N. Le développement des larves de *T. absoluta* est également plus lent dans ce cas. Or, le développement de certains pathogènes comme *Botrytis cinerea*, est, au contraire, favorisé par une faible disponibilité en azote. La réponse du bioagresseur à la disponibilité en azote dépend des exigences du bioagresseur et/ou de sa sensibilité contrastée aux composés de défense de la plante.

Dans nos conditions expérimentales, le dépôt d'un œuf de *T. absoluta* sur la plante induit une réponse limitée. La lutte chimique étant peu efficace, les études sur l'interaction de ce pathogène avec la tomate en relation avec les conditions environnementales sont à poursuivre.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Ces dernières années, une prise de conscience sur le caractère néfaste des pesticides a créé une demande sociétale forte pour des systèmes agricoles utilisant moins d'intrants tout en maintenant un rendement élevé. Ecophyto 2018, plan adopté durant le Grenelle de l'environnement, vise une réduction de l'utilisation des pesticides de 50% d'ici à 2018. Il s'agit d'un défi considérable pour les filières agricoles et pour la recherche.

De nouvelles méthodes de lutte alternatives sont nécessaires. L'une d'entre elles consiste à stimuler les défenses naturelles des plantes. Une voie consiste à créer des plantes génétiquement transformées à forte concentrations en composés de défense. Une autre voie est d'agir sur l'environnement de la plante. Or, il existe encore peu d'études de références montrant l'impact de l'environnement sur la défense des plantes. Ainsi, ma thèse s'est inscrite dans la seconde démarche, en visant à étudier l'impact des conditions environnementales sur le compromis croissance/défense dans le cadre d'une plante saine ou agressée. Stimuler la défense de la plante pose des problèmes sur le plan opérationnel de la production en raison de la compétition pour les ressources entre les composés de défense et la croissance. Les nombreuses hypothèses, dont celle de la GDB, explicitant le partage des ressources entre les métabolismes primaire (la croissance) et secondaire (la défense) ont servi de cadre conceptuel à ma question de recherche. Nous avons fait le choix d'utiliser une démarche d'écophysiologie couplée à des analyses phytochimiques et appuyée par des outils de biologie moléculaire.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai testé l'hypothèse que le ratio C/N, souvent utilisé pour illustrer le statut de croissance des plantes, est un bon indicateur du compromis entre métabolismes. Dans le cas d'une plante agressée, ce compromis est souvent délaissé car les études sont centrées sur l'effet de l'agresseur sur la croissance ou sur les mécanismes de défense. Dans la deuxième partie, j'ai introduit un bioagresseur dans l'étude afin de déterminer la réponse temporelle et spatiale de la croissance et du métabolisme secondaire de la plante à l'attaque d'un bioagresseur, sous différentes conditions de disponibilité en azote. J'ai testé l'hypothèse que le bioagresseur modifie le compromis entre la croissance et la défense, et vérifié que ces changements sont bioagresseur-dépendants.

L'innovation de ma thèse repose sur le fait d'étudier la triple interaction tomate - fertilisation azotée - bioagresseur. Durant ces trois années, j'ai étudié la réponse de la plante, appréhendée par une grande diversité de paramètres, à la variation de conditions environnementales et à la présence d'un bioagresseur (de différentes espèces). En effet, nous avons étudié la croissance et les principaux métabolites primaires, mais aussi les principaux métabolites secondaires de la tomate. De plus, nous avons considéré différents organes pour appréhender la variabilité de cette réponse au sein de la plante entière.

Le cadre expérimental de l'étude était le suivant. Nous avons d'abord fait le choix de travailler sur des jeunes plants de tomate cultivés sur système hydroponique en serre et en phytotron. Deux paramètres de l'environnement ([N] de la solution nutritive et [CO₂] atmosphérique) nous ont permis de modifier le ratio C/N des tissus. Ainsi, nous avons pu obtenir une large gamme de variations de ce ratio en vue de tester son influence sur les

concentrations en métabolites primaires et secondaires ainsi que sur la croissance. De nombreuses études antérieures ayant montré que la réponse de la plante était bioagresseur-dépendante, nous avons étudié quatre bioagresseurs différents par leur nature et leur mode d'action (un insecte *Tuta absoluta* pratiquant l'herbivorie de la plante agressée, un champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*, deux bactéries pathogènes : *Pseudomonas corrugata* et *P. syringae*). Pour étudier la réponse spatiale et temporelle, nous avons collecté les organes directement infectés ou éloignés de la zone infectée pour tester si la réponse était locale ou systémique et ce, à deux dates après l'inoculation.

Nous avons ainsi montré que les conditions environnementales agissent fortement sur le ratio C/N des tissus et sur les concentrations en métabolites primaires et secondaires dans différents organes de tomate au stade végétatif. Les variations du ratio C/N sont corrélées à celles de nombreux composés solubles de défense aux bioagresseurs que nous avons quantifiés (acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine) mais aussi à celles de certains métabolites primaires (glucose, fructose). Le fait que la tomatine, glycoalcaloïde composé de N et de C, suive la même évolution que les composés phénoliques étudiés, composés uniquement de carbone, est un résultat inattendu. Ainsi, les ressources de la plante limitées en N (ratio C/N fort) sont suffisantes pour satisfaire la demande accrue en N pour sa synthèse. En revanche, les variations des concentrations en lignine, participant aux mécanismes de défense physique, ne sont pas affectées par le ratio C/N. Ce résultat est inattendu du fait du rôle de la lignine comme métabolite de fin de chaîne de la voie des composés phénoliques. La plante favorise l'allocation des ressources à la synthèse de composés solubles de défense sans pour autant favoriser un composé de structure participant à la défense physique. Enfin, le fait de restreindre le ratio C/N aux pools des structures ou des ressources ne modifie pas les relations obtenues. Cependant, notre définition analytique des ratios C/N des ressources et structures s'est restreinte aux glucides, excluant d'autres composés majeurs comme les acides organiques et les acides aminés qu'il faudrait considérer. L'utilisation du ratio C/N total des organes pour évaluer le statut de défense des plantes est intéressante puisque ce paramètre est facilement mesurable et qu'il est modulé par les variations des disponibilités en C et N.

Nous avons montré que le ratio C/N n'était pas ou peu altéré par la présence d'un bioagresseur, alors que la répartition des ressources entre les métabolites change. En effet, lors de l'infection de *P. syringae*, les concentrations en glucides simples chutent fortement au contraire de la concentration en caffeoyl putrescine qui augmente alors que la concentration en tomatine n'est pas altérée par l'attaque. En fonction de son intensité, la réponse chimique de la plante à l'agression par *P. syringae* se propage dans toute la plante, démontrant une réponse systémique. De plus, la réponse se maintient dans le temps. Ces résultats sont innovants puisqu'à notre connaissance, personne n'a montré que la réponse de la tomate à *P. syringae* était systémique et qu'elle se maintenait aussi longtemps. Nous avons confirmé que la réponse de la plante était bioagresseur-dépendante. Par exemple, la biosynthèse de caffeoyl putrescine est fortement induite par *P. syringae* alors qu'elle ne l'est pas par *P. corrugata*. Enfin, nous avons observé qu'une faible disponibilité en azote altérait le développement de *P. syringae*, *P. corrugata* et *T. absoluta*. Néanmoins, ce résultat n'est pas valable pour tous les bioagresseurs; certains, comme *B. cinerea*, peuvent être favorisés sous limitation azotée. Il

est, de ce fait, difficile de concevoir l'application d'une règle unique sur les interactions plante/disponibilité en ressource/bioagresseur.

A notre connaissance, aucune étude sur la réponse de la plante en termes de métabolites primaires et secondaires à l'inoculation de *T. absoluta* n'a été conduite auparavant. L'expérimentation réalisée durant mon doctorat fut riche en enseignements. Nous avons montré que la concentration des métabolites primaires étudiés augmentait légèrement en présence de *T. absoluta* mais que les composés de défense n'étaient pas affectés, dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, l'herbivorie causée par les larves a induit une faible réponse chimique de la plante. Il s'agit d'une première évaluation qu'il est nécessaire d'approfondir. En effet, *T. absoluta* est un ravageur récemment apparu en France et sur qui la lutte chimique est peu efficace. Trouver des méthodes alternatives est un enjeu important pour la gestion de ce ravageur et cela nécessite un effort de recherche.

En 2012, dans le cadre d'un stage de Master 2, une deuxième expérimentation en serre à Avignon sur l'interaction tomate/*T. absoluta*/apport azoté a été mise en place. Dans cette expérimentation, deux œufs ont été déposés sur la plante. Deux récoltes, 7 jours après le dépôt des œufs et juste avant la pupation, ont permis d'étudier la réponse temporelle des plantes à la présence d'œufs puis de larves de *T. absoluta*. En addition des analyses classiques de composés phénoliques et tomatine, les concentrations en composés organiques volatils émis ont été mesurées. Cette expérimentation permettra de compléter les connaissances sur la réponse chimique de la plante à cet insecte. Néanmoins, il serait nécessaire de développer un projet de plus grande envergure sur ce pathosystème.

Un projet de thèse pour 2013 a été déposé, en collaboration avec le laboratoire « Plantes et Systèmes de culture Horticoles » de l'INRA d'Avignon et l'unité de « Recherches Intégrées en Horticulture » de l'INRA de Sophia-Antipolis. Le but est de définir précisément les coûts et bénéfices de la défense de la plante, en utilisant le pathosystème *T. absoluta*/tomate comme modèle. Il s'agit ainsi d'approfondir les connaissances sur les flux entrants de carbone (mesure en continu du taux d'assimilation nette de CO₂) et d'azote (mesure en continu de l'absorption d'azote par la plante par Totomatix) dans la plante lors du dépôt d'un œuf de *T. absoluta* puis lors de son développement. Pour coupler les données sur l'entrée de C et de N dans la plante avec la répartition des ressources entre les métabolites, des mesures de concentrations en métabolites secondaires solubles et volatils sont prévues au cours du temps, complétés par des analyses d'expressions de gènes clés des voies de biosynthèse.

Lors de deux stages de Master 2 (2011 et 2012), l'équipe a mis en oeuvre des démarches de fluxomique (suivi de phénylalanine marquée) et de métabolomique (screening des composés phénoliques détectés dans les organes de tomate). Ces démarches ont pour objectif d'affiner nos connaissances sur la répartition du carbone entre métabolismes et même entre voies de biosynthèse au sein du métabolisme secondaire. Du fait de la charge importante de travail que représente la mise en place de ces approches, il est nécessaire de créer des collaborations. Cela va donc faire l'objet d'un projet ANR en 2013 et d'un projet européen (ERA-CAPS) début 2014. Dans le projet ANR, en collaboration avec le laboratoire « Biologie du Fruit et Pathologie » de l'INRA de Bordeaux, le laboratoire « Plantes et Systèmes de culture

Horticoles » de l'INRA d'Avignon et Peter Ruoff de l'université de Stavanger (Norvège), le partage des ressources entre métabolites primaires et secondaires en réponse aux perturbations environnementales chez la tomate va être étudié par des approches de fluxomiques (suivi de phénylalanine marqué) et de métabolomique (dosage de métabolites primaires et secondaires, expression de gènes clés et activités enzymatiques). Dans ce projet, la connexion entre les métabolismes primaire et secondaire sera modifiée par des variations de la fertilisation azotée. Le projet européen (ERA-CAPS) étudiera également le partage des ressources entre métabolismes mais la connexion entre ces métabolismes sera modifiée par des variations de qualité de lumière et par l'utilisation de plants de tomate mutants (inhibant ou favorisant une voie métabolique). Ce projet regroupe les mêmes équipes que le projet ANR. Se rajoutent une équipe du « John Innes Institute » (GB) (fournissant les mutants), une équipe de l'Université de Leiden (Pays-Bas) et une équipe du Département de Génétique Moléculaire de l'Université de l'Ohio (USA). Ces deux projets fourniront des données pour l'établissement d'un modèle mécaniste de la connexion entre les métabolismes primaire et secondaire. L'un des enjeux agronomiques est de proposer, à terme, un outil de modélisation aux agriculteurs, permettant de prédire le statut de défense de leurs cultures en fonction des conditions environnementales.

L'intégralité des expérimentations de cette thèse a été réalisée sur de jeunes plants de tomate (moins de 40 JAS). En effet, l'enjeu agronomique de protection des plantes a été mis en avant au détriment de l'enjeu sur la qualité des fruits de tomate. Les parties végétatives sont les premières à faire face à l'attaque des bioagresseurs. Néanmoins, on peut se demander quels seraient les changements dans la répartition des ressources entre métabolismes en présence de fruits, considérés comme des puits, en situation de plantes saines et attaquées, sous différentes conditions de disponibilité en ressources.

Références bibliographiques

- Abro, M. A., Lecompte, F., Bryone, F., Nicot, P., 2012. "Nitrogen fertilization of the host plant influences production and pathogenicity of *Botrytis cinerea* secondary inoculum". *Phytopathology*. DOI : 10.1094/PHYTO-08-12-0189-R. *In press*.
- Adam, A., 2008. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Mémoire de thèse. Université de Liège, Belgique. 165 p.
- 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(3): 663-672.
- Adamowicz, S., Le Bot, J., Huanosto Magana, R., Fabre, J., 2012. "Totomatix: a novel automatic set-up to control diurnal, diel and long-term plant nitrate nutrition". *Annals of Botany*. 109(1): 309-319.
- Ainsworth, E. A., Rogers, A., Leakey, A. D. B., Heady, L. E., Gibon, Y., Stitt, M., Schurr, U., 2007. "Does elevated atmospheric [CO₂] alter diurnal C uptake and the balance of C and N metabolites in growing and fully expanded soybean leaves?" *Journal of Experimental Botany*. 58(3): 579-591.
- Ajouz, S., Nicot, P. C., Bardin, M., 2010. "Adaptation to pyrrolnitrin in *Botrytis cinerea* and cost of resistance". *Plant Pathology*. 59(3): 556-566.
- Albrecht, H., Yoder, J. I., Phillips, D. A., 1999. "Flavonoids Promote Haustoria Formation in the Root Parasite *Triphysaria versicolor*". *Plant Physiology*. 119(2): 585-592.
- Aniszewski, T., 2007. Alkaloids - Secrets of life. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Elsevier, Oxford. 334 p.
- Bajaj, Y. P. S., 2001. Medicinal and aromatic plants VIII, in: Bajaj, Y. P. S. (Eds), Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, Berlin, 476 p.
- Baker, C. J., Whitaker, B. D., Roberts, D. P., Mock, N. M., Rice, C. P., Deahl, K. L., Aver'yanov, A. A., 2005. "Induction of redox sensitive extracellular phenolics during plant-bacterial interactions". *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66(3): 90-98.
- Baldwin, I. T., Karb, M. J., Ohnmeiss, T. E., 1994. "Allocation of ¹⁵N from nitrate to nicotine: production and turnover of a damage-induced mobile defense". *Ecology*. 75(6): 1703-1713.
- 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.
- Bassard, J. E., Ullmann, P., Bernier, F., Werck-Reichhart, D., 2010. "Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism". *Phytochemistry*. 71: 1808-1824.
- Bazzaz, F. A., 1990. "The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels". *Annual review of Ecology and Systematics*. 21: 167-196.
- Bénard, C., 2009. Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Mémoire de thèse. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy. 264 p.
- Benhamou, N., 1996. "Elicitor-induced plant defence pathways". *Trends in Plant Science*. 1(7): 233-240.
- Benhamou, N., 2009. La résistance chez les plantes : Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Lavoisier, Paris. 376 p.
- Benhamou, N., Picard, K., 1999. "La résistance induite : une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes". *Phytoprotection*. 80(3): 137-168.
- Berber, I., Ekin, S., Battal, P., Onlu, H., Erez, M. E., 2010. "Levels of Selected Trace Elements, Phytohormones, and Sugars in *Pseudomonas*-Infected *Lycopersicon esculantum* Mill Plants". *Biological Trace Element Research*. 133(1): 98-109.
- Berger, S., Papadopoulos, M., Schreiber, U., Kaiser, W., Roitsch, T., 2004. "Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato". *Physiologia Plantarum*. 122(4): 419-428.
- Berger, S., Sinha, A. K., Roitsch, T., 2007. "Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions". *Journal of Experimental Botany*. 58(15-16): 4019-4026.

- Berlinger, M. J., 1986. Pests, in: Atherton, J. and Rudich, J. (Eds), The tomato crop: A scientific basis for improvement. Chapman and Hall, Londres, 391-432.
- Blancard, D., 2009. Les maladies de la tomate: Identifier, connaître, maîtriser. Editions Quae. 679 p.
- Bodnaryk, R. P., Palaniswamy, P., 1990. "Glucosinolate levels in cotyledons of mustard, *Brassica juncea* L. and rape, *B. napus* L. do not determine feeding rates of flea beetle, *Phyllotreta cruciferae* (Goeze)". *Journal of Chemical Ecology*. 16(9): 2735-2746.
- Bonfig, K. B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., Berger, S., 2006. "Infection with virulent and avirulent *P.syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves". *Planta*. 225(1): 1-12.
- Bonny, S., 2010. "L'intensification écologique de l'agriculture : voies et défis". Symposium "ISDA 2010 Innovation and Sustainable Development in Agriculture and Food", Montpellier, France, 11 p.
- Boughton, A. J., Hoover, K., Felton, G. W., 2006. "Impact of chemical elicitor applications on greenhouse tomato plants and population growth of the green peach aphid, *Myzus persicae*". *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 120: 175-188.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., Matern, U., 2006. "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes". *Phytochemistry Reviews*. 5: 293-308.
- Bovy, A., Schijlen, E., Hall, R. D., 2007. "Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics". *Metabolomics*. 3(3): 399-412.
- Brown, P. D., Tokuhisa, J. G., Reichelt, M., Gershenzon, J., 2003. "Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*". *Phytochemistry*. 62(3): 471-481.
- Bryant, J. P., Chapin, F. S., Klein, D. R., 1983. "Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory (hare *Lepus capensis*)". *Oikos*. 40(3): 357-368.
- Buell, C. R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I. T., Gwinn, M. L., Dodson, R. J., Deboy, R. T., Durkin, A. S., Kolonay, J. F. *et al.*, 2003. "The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(18): 10181-10186.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Mathieu, R., 2004. Biologie. De Boeck Université, Bruxelles. 1482 p.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P., 1999. "Nitrate accumulation in plants: a role for water". *Journal of Experimental Botany*. 50: 613-624.
- 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.
- Cataldi, T. R. I., Lelario, F., Bufo, S. A., 2005. "Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 19(21): 3103-3110.
- Catara, V., 2007. "*Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource ?" *Molecular Plant Pathology*. 8(3): 233-244.
- Chaillou, S., Lamaze, T., 1997. Nutrition ammoniacale des plantes in: Morot-Gaudry, J. F. (Eds), Assimilation de l'azote chez les plantes : Aspects physiologique, biochimique et moléculaire. INRA, Paris, 67-84.
- Chang, A., Lim, M. H., Lee, S. W., Robb, E. J., Nazar, R. N., 2008. "Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized". *The Journal of biological chemistry*. 283(48): 33591-33601.
- Clé, C., Hill, L. M., Niggeweg, R., Martin, C. R., Guisez, Y., Prinsen, E., Jansen, M. A., 2008. "Modulation of chlorogenic acid biosynthesis in *Solanum lycopersicum*; consequences for phenolic accumulation and UV-tolerance". *Phytochemistry*. 69(11): 2149-2156.
- Collinge, D. B., 2009. "Cell wall appositions : the first line of defence". *Journal of Experimental Botany*. 60(2): 351-352.
- Corbaz, R., 1990. Maladies des plantes et leurs agents, in: Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. PPUR presses polytechniques, Lausanne, 1-18.

- Costa, J. M., Heuvelink, E., 2005. Introduction : The tomato crop and industry, in: Heuvelink, E. (Eds), Tomatoes. CABI Publishing, 1-20.
- Cox, W. J., Reisenauer, H. M., 1973. "Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both". *Plant and Soil*. 38(2): 363-380.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G., 2000. Natural products (Secondary metabolites), in: Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. (Eds), Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Nutrition, Rockville, 1250-1318.
- Csizinszky, A. A., Schuster, D. J., Jones, J. B., Van Lenteren, J. C., 2005. Crop protection, in: Heuvelink, E. (Eds), Tomatoes. CABI Publishing, 199-237.
- De Jong, W. S., Eannetta, N. T., De Jong, D. M., Bodis, M., 2004. "Candidate gene analysis of anthocyanin pigmentation loci in the Solanaceae". *Theoretical and Applied Genetics*. 108(3): 423-432.
- de Oliveira, C. M., de Andrade, V. C., Maluf, W. R., Neiva, I. P., Maciel, G. M., 2012. "resistance of tomato strains to the moth *Tuta absoluta* imparted by allelochemicals and trichome density". *Ciencia E Agrotecnologia*. 36(1): 45-52.
- de Resende, J. T. V., Maluf, W. R., Faria, M. V., Pfann, A. Z., do Nascimento, E. R., 2006. "Acylsugars in tomato leaflets confer resistance to the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta* Meyr". *Scientia Agricola*. 63(1): 20-25.
- Decognet, V., Ravetti, F., Martin, C., Nicot, P. C., 2010. "Improved leaf pruning reduces development of stem cankers caused by grey mould in greenhouse tomatoes". *Agronomy for Sustainable Development*. 30(2): 465-472.
- Degenhardt, D. C., Refi-Hind, S., Stratmann, J. W., Lincoln, D. E., 2010. "Systemin and jasmonic acid regulate constitutive and herbivore-induced systemic volatile emissions in tomato, *Solanum lycopersicum*". *Phytochemistry*. 71: 2024-2037.
- Desneux, N., Luna, M. G., Guillemaud, T., Urbaneja, A., 2011. "The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production". *Journal of Pest Science*. 84(4): 403-408.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A. G., Burgio, G., Arpaia, S., Narvaez-Vasquez, C. A., Gonzalez-Cabrera, J., Ruescas, D. C., Tabone, E., Frandon, J. *et al.*, 2010. "Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control". *Journal of Pest Science*. 83(3): 197-215.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L., 1995. "Stress-induced phenylpropanoid metabolism". *The Plant Cell*. 7: 1085-1097.
- Doré, T., Makowski, D., Malézieux, E., Munier-Jolain, N., Tchamitchian, M., Tittone, P., 2011. "Facing up to the paradigm of ecological intensification in agronomy: Revisiting methods, concepts and knowledge". *European Journal of Agronomy*. 34(4): 197-210.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., Orlova, I., 2006. "Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives". *Critical Reviews in Plant Sciences*. 25(5): 417-440.
- Dudareva, N., Pichersky, E., 2008. "Metabolic engineering of plant volatiles". *Current Opinion in Biotechnology*. 19(2): 181-189.
- 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.
- Ecole, C. C., Picanco, M. C., Guedes, R. N. C., Brommonschenkel, S. H., 2001. "Effect of cropping season and possible compounds involved in the resistance of *Lycopersicon hirsutum* f. *typicum* to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae)". *Journal of Applied Entomology*. 125(4): 193-200.
- El Oirdi, M., Abd El Rahman, T., Rigano, L., El Hadrami, A., Rodriguez, M. C., Daayf, F., Vojnov, A., Bouarab, K., 2011. "*Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato". *Plant Cell*. 23(6): 2405-2421.
- 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.
- Facchini, P. J., Hagel, J., Zulak, K. G., 2002. "Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry". *Canadian Journal of Botany*. 80(6): 577-589.

- Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P., 2001. "The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants". *Phytochemistry*. 56(1): 5-51.
- Faure, J. D., Meyer, C., Caboche, M., 1997. Assimilation du nitrate : nitrate et nitrite réductase, in: Morot-Gaudry, J. F. (Eds), *Assimilation de l'azote chez les plantes*. INRA, Paris, 422 p.
- Fleuriet, A., Macheix, J.-J., 1981. "Quinyl esters and glucose derivatives of hydroxycinnamic acids during growth and ripening of tomato fruit". *Phytochemistry*. 20(4): 667-671.
- Friedman, M., 2002. "Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(21): 5751-5780.
- Friedman, M., 2004. "Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds". *Journal of Chromatography A*. 1054: 143-155.
- Fritz, C., Mueller, C., Matt, P., Feil, R., Stitt, M., 2006a. "Impact of the C-N status on the amino acid profile in tobacco source leaves". *Plant, Cell and Environment*. 29(11): 2055-2076.
- Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., Stitt, M., 2006b. "Regulation of secondary metabolism by the carbon:nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism". *The Plant Journal*. 46(4): 533-548.
- Gayler, S., Grams, T. E. E., Heller, W., Treutter, D., Priesack, E., 2008. "A dynamical model of environmental effects on allocation to carbon-based secondary compounds in juvenile trees". *Annals of Botany*. 101(8): 1089-1098.
- Geiger, M., Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U., Stitt, M., 1999. "The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco". *Plant, Cell and Environment*. 22(10): 1177-1199.
- Grechi, I., Vivin, P., Hilbert, G., Milin, S., Robert, T., Gaudillère, J. P., 2007. "Effect of light and nitrogen supply on internal C:N balance and control of root-to-shoot biomass allocation in grapevine". *Environmental and Experimental Botany*. 59(2): 139-149.
- Grignon, C., Thibaud, J. B., Lamaze, T., 1997. Transport du nitrate par la racine, in: Morot-Gaudry, J. F. (Eds), *Assimilation de l'azote chez les plantes*. INRA, Paris, 422 p.
- Gustine, D. L., Sherwood, R. T., Moyer, B. G., Lukezic, F. L., 1990. "Metabolites from *pseudomonas corrugata* elicit phytoalexin biosynthesis in white clover". *Physiology and Biochemistry*. 80(12): 1427-1432.
- Hamilton, J. G., Zangerl, A. R., DeLucia, E. H., Berenbaum, M. R., 2001. "The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall". *Ecology Letters*. 4: 86-95.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D., 1996. "Resistance gene-dependent plant defense responses". *The Plant Cell*. 8(10): 1773-1791.
- Hartley, S. E., Jones, C. G., Couper, G. C., Jones, T. H., 2000. "Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO₂". *Global Change Biology*. 6(5): 497-506.
- Haynes, R. J., Goh, K. M., 1978. "Ammonium and nitrate nutrition of plants". *Biological Reviews*. 53(4): 465-510.
- Hemann, M., Lukačín, R., Ekiert, H., Matern, U., 2004. "Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L. Cloning of bergaptol O-methyltransferase". *European Journal of Biochemistry*. 271: 932-940.
- Herms, D. A., Mattson, W. J., 1992. "The dilemma of plants: to grow or defend". *The quarterly Review of Biology*. 67(3): 283-335.
- Hoffland, E., Dicke, M., Van Tintelen, W., Dijkman, H., Van Beusichem, M. L., 2000a. "Nitrogen availability and defense of tomato against two-spotted spider mite". *Journal of Chemical Ecology*. 26(12): 2697-2711.
- Hoffland, E., Jeger, M. J., Van Beusichem, M. L., 2000b. "Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen". *Plant and Soil*. 218(1-2): 239-247.
- Hoffland, E., Van Beusichem, M. L., Jeger, M. J., 1999. "Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*". *Plant and Soil*. 210(2): 263-272.
- Huanosto Magaña, R., Adamowicz, S., Pagès, L., 2009. "Diel changes in nitrogen and carbon resource status and use for growth in young plants of tomato (*Solanum lycopersicum*)". *Annals of Botany*. 103(7): 1025-1037.

- Huber, D. M., Thompson, I. A., 2007. Nitrogen and plant disease, in: Datnoff, L. E., Elmer, W. H. and Huber, D. M. (Eds), Mineral nutrition and plant disease. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA, 31-44.
- Ibrahim, M. H., Jaafar, H. Z. E., Rahmat, A., Rahman, Z. A., 2011. "The relationship between phenolics and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO₂ and nitrogen fertilization". *Molecules*. 16(1): 162-174.
- Jones, J. B., Jones, J. P., Miller, J. W., 1982. Pith necrosis of tomato, in: Plant Pathology Circular. Florida Dept. Agric. & Consumer Services, N°243.
- Kambale Valimunzigha, C., 2006. Etude du comportement physiologique et agronomique de la tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en réponse à un stress hydrique précoce. Mémoire de thèse. Université catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve, Belgique. 196 p.
- Kaplan, I., Halitschke, R., Kessler, A., Sardanelli, S., Denno, R. F., 2008. "Constitutive and induced defenses to herbivory in above- and belowground plant tissues". *Ecology*. 89: 392-406.
- Keller, H., Hohlfeld, H., Wray, V., Hahlbrock, K., Scheel, D., Strack, D., 1996. "Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*". *Phytochemistry*. 42(2): 389-396.
- Keukens, E. A. J., de Vrije, T., van den Boom, C., de Waard, P., Plasman, H. H., Thiel, F., Chupin, V., Jongen, W. M. F., de Kruijff, B., 1995. "Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1240(2): 216-228.
- Keukens, E. A. J., Hop, M. E. C. M., Jongen, W. M. F., 1994. "Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantification of α -tomatine in tomato". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42(11): 2475-2477.
- 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.
- Kozukue, N., Han, J., Lee, K., Friedman, M., 2004. "Dehydrotomatine and α -tomatine content in tomato fruits and vegetative plant tissues". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(7): 2079-2083.
- Larbat, R., Le Bot, J., Bourgaud, F., Robin, C., Adamowicz, S., 2012a. "Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation". *Plant Biology*. 14(5): 760-769.
- Larbat, R., Olsen, K. M., Slimestad, R., Løvdal, T., Bénard, C., Verheul, M., Bourgaud, F., Robin, C., Lillo, C., 2012b. "Influence of repeated short-term nitrogen limitations on leaf phenolics metabolism in tomato". *Phytochemistry*. 77: 119-28.
- Le Bot, J., Bénard, C., Robin, C., Bourgaud, F., Adamowicz, S., 2009. "The 'trade-off' between synthesis of primary and secondary compounds in young tomato leaves is altered by nitrate nutrition: experimental evidence and model consistency". *Journal of Experimental Botany*. 60(15): 4301-4314.
- Lecompte, F., Abro, M. A., Nicot, P. C., 2010. "Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes". *Plant Pathology*. 59(5): 891-899.
- Lee, E.-J., Paek, K.-Y., 2012. "Effect of nitrogen source on biomass and bioactive compound production in submerged cultures of *Eleutherococcus koreanum nakai* adventitious roots". *Biotechnology Progress*. 28(2): 508-514.
- Leite, G. L. D., Picanço, M., Azevedo, A. A., Silva, D. J. H., Gusmão, M. R., 1997. "Intensidade de ataque de *Frankliniella schulzei* e *Myzus persicae* em três introduções de *Lycopersicon peruvianum*". *revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida*. 19: 27-35.
- Leite, G. L. D., Picanço, M., Jham, G. N., Marquini, F., 2004. "Intensity of *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae) attacks on *Lycopersicum esculentum* Mill. leaves". *Ciencia E Agrotecnologia*. 28(1): 42-48.
- Leite, G. L. D., Picanço, M., Zanuncio, J. C., Moreira, M. D., Jham, G. N., 2011. "Hosting capacity of horticultural plants for insect pests in Brazil". *Chilean Journal of Agricultural Research*. 71(3): 383-389.

- Letourneau, D. K., Drinkwater, L. E., Shennan, C., 1996. "Effects of soil management on crop nitrogen and insect damage in organic vs conventional tomato fields". *Agriculture Ecosystems & Environment*. 57(2-3): 179-187.
- Li, J., Zhou, J. M., Duan, Z. Q., 2007. "Effects of elevated CO₂ concentration on growth and water usage of tomato seedlings under different ammonium/nitrate ratios". *Journal of Environmental Sciences*. 19(9): 1100-1107.
- Li, J. Y., Liu, X. H., Cai, Q. S., Gu, H., Zhang, S. S., Wu, Y. Y., Wang, C. J., 2008. "Effects of elevated CO₂ on growth, carbon assimilation, photosynthate accumulation and related enzymes in rice leaves during sink-source transition". *Journal of Integrative Plant Biology*. 50(6): 723-732.
- Loomis, W. E., 1932. "Growth-differentiation balance vs. carbohydrate-nitrogen ratio". *Proceedings of the American Society of Horticultural Sciences*. 29: 240-245.
- López-Gresa, M. P., Maltese, F., Bellés, J. M., Conejero, V., Kim, H. K., Choi, Y. H., Verpoorte, R., 2010. "Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions". *Phytochemical Analysis*. 21(1): 89-94.
- López-Gresa, M. P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J. M., Conejero, V., 2011. "Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*". *Environmental and Experimental Botany*. 74: 216-228.
- Lopez, J., Tremblay, N., Voogt, W., Dubé, S., Gosselin, A., 1996. "Effects of varying sulphate concentrations on growth, physiology and yield of the greenhouse tomato". *Scientia Horticulturae*. 67: 207-217.
- Løvdaal, T., Lillo, C., 2009. "Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress". *Analytical Biochemistry*. 387: 238-242.
- Løvdaal, T., Olsen, K. M., Slimestad, R., Verheul, M., Lillo, C., 2010. "Synergic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato". *Phytochemistry*. 71: 605-613.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne. 192 p.
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. J., 1994. "Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(16): 7802-7806.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., Raskin, I., 1990. "Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection". *Science*. 250(4983): 1002-1004.
- Maluf, W. R., Maciel, G. M., Gomes, L. A. A., Cardoso, M. d. G., Goncalves, L. D., Da Silva, E. C., Knapp, M., 2010. "Broad-Spectrum Arthropod Resistance in Hybrids between High- and Low-Acylsugar Tomato Lines". *Crop science*. 50(2): 439-450.
- Marschner, H., 1995. Relationship between mineral nutrition and plant diseases and pests, in: Marschner, H. (Eds), Mineral nutrition of higher plants (seconde édition). Academic Press, Londres, 436-460.
- Matros, A., Amme, S., Kettig, B., Buck-Sorlin, G. H., Sonnewald, U., Mock, H. P., 2006. "Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with *potato virus Y*". *Plant, Cell and Environment*. 29(1): 126-137.
- Mattson, J. W., Julkunen-Tiitto, R., Herms, D. A., 2005. "CO₂ enrichment and carbon partitioning to phenolics: do plant responses accord better with the protein competition or the growth differentiation balance models?" *Oikos*. 111: 337-347.
- McKey, D., 1974. "Adaptative patterns in alkaloid physiology". *The American Naturalist*. 108: 305-320.
- Mehrer, I., Mohr, H., 1989. "Ammonium toxicity: description of the syndrome in *Sinapis alba* and the search for its causation". *Physiologia Plantarum*. 77(4): 545-554.
- Mert-Türk, F., 2002. "Phytoalexins: Defence or just a response to stress ?" *Journal of Cell and Molecular Biology*. 1: 1-6.

- Meyer, S., Reeb, C., Bosdeveix, R., 2004. Botanique, biologie et physiologie végétales. Maloine, Paris. 461 p.
- Mihaliak, C. A., Lincoln, D. E., 1985. "Growth pattern and carbon allocation to volatile leaf terpenes under nitrogen-limiting conditions in *Heterotheca subaxillaris* (Asteraceae)". *Oecologia*. 66(3): 423-426.
- Milner, S. E., Brunton, N. P., Jones, P. W., O' Brien, N. M., Collins, S. G., Maguire, A. R., 2011. "Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *solanum* species". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(8): 3454-3484.
- Mittelstraß, K., Treutter, D., Pleßl, M., Heller, W., Elstner, E. F., Heiser, I., 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(5): 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(4): 1205-1218.
- Mollà, O., Montón, H., Vanaeloch, P., Bieitia, F., Urbaneja, A., 2009. "Predation by the mirids *Nesidiocoris tenuis* and *Macrolophus pygmaeus* on the tomato borer *Tuta absoluta*". IOBC/WPRS Working Group "Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate", Crète, 209-214.
- Montanari, M., Degl'Innocenti, E., Maggini, R., Pacifici, S., Pardossi, A., Guidi, L., 2008. "Effect of nitrate fertilization and saline stress on the contents of active constituents of *Echinacea angustifolia* DC". *Food Chemistry*. 107(4): 1461-1466.
- Morot-Gaudry, J. F., 2012. Métabolisme secondaire : quelques aspects, in: Biologie végétale Croissance et développement. Dunod, Paris, 217-227.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffiere, A., Yan, S. C., Dominguez, H., Thompson, B. M., 2008. "The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle". *The Isme Journal*. 2(3): 321-334.
- Morrison, I. M., Stewart, D., 1995. "Determination of lignin in the presence of ester-bound substituted cinnamic acids by a modified acetyl bromide procedure". *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 69(2): 151-157.
- Naika, S., Van Lidt de Jeude, J., De Goffau, M., Van Dam, B., 2005. La culture de la tomate production, transformation et commercialisation. Agromisa Foundation, Wageningen. 105 p.
- Niggeweg, R., Michael, A., Martin, C., 2004. "Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid". *Nature Biotechnology*. 22(6): 746-754.
- Nugroho, L. H., Peltenburg-Looman, A. M. G., de Vos, H., Verberne, M. C., Verpoorte, R., 2002. "Nicotine and related alkaloids accumulation in constitutive salicylic acid producing tobacco plants". *Plant Science*. 162: 575-581.
- Nuringtyas, T. R., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Klinkhamer, P. G. L., Leiss, K. A., 2012. "Differential tissue distribution of metabolites in *Jacobaea vulgaris*, *Jacobaea aquatica* and their crosses". *Phytochemistry*. 78: 89-97.
- Osborn, A. E., 1996. "Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack". *The Plant Cell*. 8: 1821-1831.
- Papy, F., Goldringer, I., 2011. "Cultiver la biodiversité". *Courrier de l'environnement de l'INRA*. 60: 55-62.
- Park, S., Jeong, W. Y., Lee, J. H., Kim, Y.-H., Jeong, S. W., Kim, G.-S., Bae, D. W., Lim, C.-S., Jin, J. S., Lee, S. J. *et al.*, 2012. "Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Food Chemistry*. 130(4): 981-985.
- Peet, M. M., Welles, G. W. H., 2005. Greenhouse tomato production, in: Heuvelink, E. (Eds), Tomatoes. CABI Publishing, 257-305.
- Peñalosa, J. M., Sarro, M. J., Revilla, E., Carpena, R., Cadahía, C., 1989. "Influence of phosphorus supply on tomato plant nutrition". *Journal of Plant Nutrition*. 12(5): 647-657.
- Peñuelas, J., Estiarte, M., 1998. "Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function?" *Trends in Ecology & Evolution*. 13(1): 20-24.

- Peñuelas, J., Estiarte, M., Llusà, J., 1997. "Carbon-based secondary compounds at elevated CO₂". *Photosynthetica*. 33(2): 313-316.
- Pereira, G. V. N., Maluf, W. R., Goncalves, L. D., do Nascimento, D. R., Gomes, L. A. A., Licursi, V., 2008. "Selection towards high acylsugar levels in tomato genotypes and its relationship with resistance to spider mite (*Tetranychus evansi*) and to the South American pinworm (*Tuta absoluta*)". *Ciencia E Agrotecnologia*. 32(3): 996-1004.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S. C. M., 2009. "Networking by small-molecule hormones in plant immunity". *Nature Chemical Biology*. 5(5): 308-316.
- Pitchay, D. S., 2007. "Impact of applied nitrogen concentration on growth of elatior Begonia and New Guinea Impatiens and susceptibility of Begonia to *Botrytis cinerea*". *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132: 193-201.
- Poovaiah, B. W., Reddy, A. S. N., Feldman, L., 1993. "Calcium and signal transduction in plants". *Critical Reviews in Plant Sciences*. 12(3): 185-211.
- Quidde, T., Osbourn, A. E., Tudzynski, P., 1998. "Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*". *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 52(3): 151-165.
- R'Houma, A., Chérif, M., Boubaker, A., 1998. "Effect of nitrogen fertilizing, green pruning and fungicide treatments on *Botrytis* bunch rot of grapes". *Journal of Plant Pathology*. 80: 115-124.
- Radojčić redovniković, I., Glivetić, T., Delonga, K., Vorkapić-Furač, J., 2008. "Glucosinolates and their potential role in plant". *Periodicum Biologorum*. 110(4): 297-309.
- 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.
- Raghava, T., Ravikumar, P., Hegde, R., Kush, A., 2010. "Spatial and temporal volatile organic compound response of select tomato cultivars to herbivory and mechanical injury". *Plant Science*. 179(5): 520-526.
- Ramel, J. M., Oudard, E., 2008. Fiche de reconnaissance de *Tuta absoluta* Draaf Lorraine.
- Rasmy, A. H., 1985. "The biology of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* as affected by resistant solanaceous plants". *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 13(3-4): 325-328.
- Reisdorf-Cren, M., 2012. La plante et son environnement biotique, in: Biologie végétale : croissance et développement. Dunod, Paris, 187-216.
- Ricochon, G., Paris, C., Girardin, M., Muniglia, L., 2011. "Highly sensitive, quick and simple quantification method for mono and disaccharides in aqueous media using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS)". *Journal of Chromatography B*. 879(19): 1529-1536.
- Roberts, M. R., Paul, N. D., 2006. "Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens". *New Phytologist*. 170: 677-699.
- Royer, M., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., Robin, C., 2013. "Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato?" *Phytochemistry*. DOI : 10.1016/j.phytochem.2012.12.003. *In press*.
- Ruan, J., Haerdter, R., Gerendás, J., 2010. "Impact of nitrogen supply on carbon/nitrogen allocation: a case study on amino acids and catechins in green tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] plants". *Plant Biology*. 12(5): 724-734.
- Rufty, T. W., Jackson, D. M., Severson, R. F., Lam, J. J., Snook, M. E., 1989. "Alterations in growth and chemical constituents of tobacco in response to carbon dioxide enrichment". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 37(2): 552-555.
- 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.
- Ruiz, J. M., Rivero, R. M., Lopez-Cantarero, I., Romero, L., 2003. "Role of Ca²⁺ in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.)". *Plant Growth Regulation*. 41(2): 173-177.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., Hunt, M. D., 1996. "Systemic acquired resistance". *Plant Cell*. 8(10): 1809-1819.

- Sánchez-Rodríguez, E., Ruiz, J. M., Ferreres, F., Moreno, D. A., 2012. "Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique". *Food Chemistry*. 134(2): 775-782.
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., Shibata, D., Aoki, K. *et al.*, 2012. "The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution". *Nature*. 485(7400): 635-641.
- Schädler, M., Roeder, M., Brandl, R., Matthies, D., 2007. "Interacting effects of elevated CO₂, nutrient availability and plant species on a generalist invertebrate herbivore". *Global Change Biology*. 13(5): 1005-1015.
- Scheel, D., 1998. "Resistance response physiology and signal transduction". *Current Opinion in Plant Biology*. 1(4): 305-310.
- 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". *The Plant Cell*. 9(5): 783-798.
- Shadle, G. L., Wesley, S. V., 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(1): 153-161.
- 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.
- Smoleń, S., Sady, W., 2009. "The effect of various nitrogen fertilization and foliar nutrition regimes on the concentrations of sugars, carotenoids and phenolic compounds in carrot (*Daucus carota* L.)". *Scientia Horticulturae*. 120(3): 315-324.
- Solomon, P. S., Tan, K.-C., Oliver, R. P., 2003. "The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study". *Molecular Plant Pathology*. 4(3): 203-210.
- Stamp, N., 2003. "Out of the quagmire of plant defense hypotheses". *The quarterly Review of Biology*. 78(1): 23-55.
- Stamp, N., 2004. "Can the growth-differentiation balance hypothesis be tested rigorously?" *Forum*. 107(2): 439-448.
- Stitt, M., 1999. "Nitrate regulation of metabolism and growth". *Current Opinion in Plant Biology*. 2(3): 178-186.
- Stitt, M., Krapp, A., 1999. "The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background". *Plant, Cell and Environment*. 22(6): 583-621.
- 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.
- Thaler, J. S., 1999. "Induced resistance in agricultural crops: effects of jasmonic acid on herbivory and yield in tomato plants". *Environmental Entomology*. 28: 30-37.
- Tischner, R., Kaiser, W., 2007. Nitrate assimilation in plants, in: Bothe, H., Ferguson, S J, Newton. (Eds), Biology of the Nitrogen Cycle. Elsevier B.V, Amsterdam, 427 p.
- 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.
- Traugott, M. S., Stamp, N., 1997. "Effects of chlorogenic acid and tomatine-fed caterpillars on performance of an insect predator". *Oecologia*. 109: 265-272.
- Treutter, D., 2006. "Significance of flavonoids in plant resistance: a review". *Environmental Chemistry Letters*. 4(3): 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.
- Van Baarlen, P., Legendre, L., Van Kan, J. A. L., 2004. Plant defence compounds against *Botrytis* infection, in: Elad, Y. (Eds), Botrytis: biology, pathology and control. Kluwer Academic Publishers, Pays-Bas, 143-161.
- Van De Vooren, J., Welles, G. W. H., Hayman, G., 1986. Glasshouse crop production, in: Atherton, J. G. and Rudich, J. (Eds), The tomato crop : A scientific basis for improvement. Chapman and Hall, Londres, 581-624.

- Van Etten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., Farmer, E. E., 1994. "Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins"". *The Plant Cell*. 6(9): 1191-1192.
- Vercambre, G., Adamowicz, S., 1996. "Dosage de l'ion nitrate en solution nutritive et en présence de polyéthylène glycol par spectrométrie UV". *Agronomie*. 16(2): 73-87.
- Verpoorte, R., Memelink, J., 2002. "Engineering secondary metabolite production in plants". *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 181-187.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Schripsema, J., 1993. "Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects". *Journal of Natural Products*. 56(2): 186-207.
- Vidal, E. A., Gutiérrez, R. A., 2008. "A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*". *Current Opinion in Plant Biology*. 11(5): 521-529.
- Von Roepenack-Lahaye, E., Newman, M., Schornack, S., Hammond-Kosack, K. E., Lahaye, T., Jones, J. D. G., Daniels, M. J., Dow, J. M., 2003. "*p*-Coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens". *Journal of Biological Chemistry*. 278(44): 43373-43383.
- Watterson, J. C., 1986. Disease, in: Atherton, J. G. and Rudich, J. (Eds), The tomato crop: A scientific basis for improvement. Chapman and Hall, Londres, 443-484.
- Wilkens, 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.
- Yahara, S., Uda, N., Nohara, T., 1996. "Lycopersides A-C, three stereoisomeric 23-acetoxyspirosolan-3 β -ol β -lycotetraosides from *Lycopersicon esculentum*". *Phytochemistry*. 42(1): 169-172.
- Yermiyahu, U., Shamai, I., Peleg, R., Dudai, N., Shtienberg, D., 2006. "Reduction of *Botrytis cinerea* sporulation in sweet basil by altering the concentrations of nitrogen and calcium in the irrigation solution". *Plant Pathology*. 55: 544-552.
- Zacarés, L., López-Gresa, M. P., Fayos, J., Primo, J., Bellés, J. M., Conejero, V., 2007. "Induction of *p*-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*". *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(11): 1439-1448.
- Zobel, A. M., Brown, S. A., 1990. "Seasonal changes of furanocoumarin concentrations in leaves of *Heracleum lanatum*". *Journal of Chemical Ecology*. 16(5): 1623-1634.
- Zornoza, P., Sanz, J., Carpena, O., 1991. "Analysis of the interaction between light and the type of nitrogen nutrition in tomato plants". *Suelo y Planta*. 1(3): 389-398.

Liste des figures

- Figure 1: Schéma simplifié des principaux mécanismes physiques et biochimiques de défense de la plante en réponse à l'infection – 1 : Reconnaissance des deux protagonistes par émission d'éliciteurs – 2 : Dépolarisation membranaire et augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule permettant d'activer une enzyme impliquée dans la formation de callose, barrière physique – 3 : la réaction d'hypersensibilité s'accompagne d'un burst oxydatif fournissant des messagers secondaires pour l'activation des mécanismes de défense plus tardifs – 4 : Activation de gènes de défense permettant d'activer la synthèse de phytoalexines, protéases, chitinases – 5 : Production de messagers secondaires (acide jasmonique, acide salicylique...) et diffusion dans toute la plante pour activer une résistance systémique à l'infection. D'après Benhamou et Picard (1999)..... 10
- Figure 2: Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des composés phénoliques. PAL : phénylalanine ammonia-lyase. C4H : cinnamate 4 hydroxylase. 4CL : 4-coumarate CoA ligase. CHS : chalcone synthase. CHI : chalcone isomérase. 13
- Figure 3: Molécule de chalcone, premier composé produit dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes 14
- Figure 4: Molécule d'acide chlorogénique (A.), de rutine (B.) et de kaempferol-rutinoside (C.) 15
- Figure 5: Représentation de la molécule d' α -tomatine composée d'un stéroïde la tomatidine lié par un groupe OH à une chaîne glucidique lycotetraose..... 17
- Figure 6: Schéma d'une voie de biosynthèse possible des principaux glycoalcaloïdes dérivés du cholestérol – d'après Milner *et al.* (2011) 17
- Figure 7: Représentation des composés α -tomatine (A) et déhydrotomatine (B) différant seulement par une double liaison entourée en rouge – d'après Friedman (2002)..... 17
- Figure 8: Représentation des 3 glycoalcaloïdes dérivés de la tomatine isolés par Yahara *et al.* (1996) dans les feuilles et les fruits de tomate – OAc est le groupement acétoxy qui les différencie de la tomatine. 18
- Figure 9 : Structure type d'une furocoumarine linéaire (A.) et angulaire (B.) – La variabilité de R5 et R6 permet de différencier les molécules – D'après Bourgaud *et al.* (2006)..... 19
- Figure 10 : Schéma du noyau commun aux alcaloïdes pyrrolizidiniques : la pyrrolizidine (A.) et du noyau commun aux alcaloïdes quinolizidiniques : la quinolizidine (B.) 22
- Figure 11 : Schéma de deux alcaloïdes isoquinoliniques : la codéine (A.) et la morphine (B.) 22
- Figure 12: Représentation d'un glucosinolate..... 23

Figure 13: Schéma simplifié de l'assimilation du nitrate et de l'ammonium dans une cellule photosynthétique. NAR : nitrate réductase – NIR : nitrite réductase – GS : glutamine synthétase – GOGAT : glutamate synthase. D'après Meyer <i>et al.</i> (2004).....	25
Figure 14: Graphique montrant l'effet de la concentration et de la forme d'azote sur le rendement de plants de blé. D'après Cox <i>et al.</i> (1973).....	27
Figure 15: Schéma d'ensemble de la photosynthèse intégrant les deux phases : les réactions photochimiques et le cycle de Calvin (Campbell <i>et al.</i> , 2004) – PGAL : phosphoglycéraldéhyde.....	28
Figure 16: Diagramme représentatif de l'effet de la disponibilité en ressources sur le compromis entre croissance et métabolisme secondaire, selon l'hypothèse GDB. D'après Loomis (1932) et Herms et Mattson (1992) dans Le Bot <i>et al.</i> (2009).....	31
Figure 17: A. Larve de <i>Tuta absoluta</i> 1 semaine après éclosion. B. Galeries creusées par une larve de <i>Tuta absoluta</i> sur feuille de tomate.	34
Figure 18: A. Taches circulaires brunes avec cercles concentriques sur feuilles de tomate. B. Chancre sur pétiole commençant à affecter la tige	36
Figure 19: A. Taches graisseuses, noires entourées d'un halo jaune sur feuilles de tomate. B. Minuscules taches noires en relief sur fruits verts de tomate.....	38
Figure 20: A. Coupe transversale d'une tige de tomate infectée par <i>P. corrugata</i> . B. Coupe longitudinale d'une tige de tomate infectée par <i>P. corrugata</i> . La moelle est nécrosée.	39
Figure 21: A: Bac de germination recouvert d'une plaque percée d'orifices accueillant les poquets – B : Schéma d'un poquet.....	47
Figure 22: Plantules prêtes pour le transfert sur le dispositif en serre – Cotylédons émergeant du poquet – Bague en PVC autour du poquet permettant de régler la hauteur.	47
Figure 23: Schéma du dispositif hydroponique.....	47
Figure 24: Photos du dispositif de culture hydroponique. A. Les supports hydroponiques (blancs) reliés au tube noir par des tuyaux souples. B. Le poquet placé sur une plaque PVC elle-même placée sur l'orifice du support hydroponique. C. Les plantes en place sur le dispositif - Les bacs sont couverts d'une bâche opaque pour éviter la prolifération d'algues à la lumière.....	48
Figure 25: Disposition en bloc des plantes dans les serres	49
Figure 26: Schéma d'échantillonnage de l'expérimentation à l'INRA de Champenoux.....	51
Figure 27: Dispositif de germination en Avignon.....	52
Figure 28: Dispositif de culture hydroponique en phytotron	52

Figure 29 : Disposition des traitements de l'expérimentation <i>Pseudomonas</i> dans un des deux phytotrons. La disposition est la même dans le deuxième phytotron - D'après S. Adamowicz (INRA Avignon)	53
Figure 30: Disposition des traitements de l'expérimentation <i>Tuta absoluta</i> dans un des deux phytotrons. La disposition est la même dans le deuxième phytotron - D'après S.Adamowicz (INRA Avignon)	54
Figure 31: Disposition des traitements de l'expérimentation <i>Botrytis cinerea</i> dans un des deux phytotrons. La disposition est la même dans le deuxième phytotron - D'après S. Adamowicz	54
Figure 32: Interface automatique "Totomatix" d'ajustement du pH, de la concentration en azote et de la hauteur d'eau des cuves.....	55
Figure 33: A. Œufs de <i>Tuta</i> sur la face inférieure d'une feuille. B. Mode de transport des œufs de <i>Tuta</i>	57
Figure 34 : A. Dépôt de l'œuf sur la foliole terminale de la feuille N°5. B. Feuille inoculée ensachée dans la poche en voilage. Plante identifiée par une étiquette déposée au fond de la poche	57
Figure 35 : Dépôt de 10µl de suspension de spores de <i>Botrytis cinerea</i> sur la blessure causée par la coupe de la feuille N°4 à 2cm de l'insertion du pétiole.	58
Figure 36: Mesures d'échanges gazeux sur une foliole à l'aide de la chambre de l'appareil Li-Cor 6400.....	59
Figure 37: Schéma d'échantillonnage de l'expérimentation <i>Pseudomonas</i> . A : Echantillonnage lors de l'inoculation par <i>P. corrugata</i> . B : Echantillonnage lors de l'inoculation par <i>P. syringae</i>	60
Figure 38: Schéma d'échantillonnage de l'expérimentation <i>Tuta absoluta</i>	61
Figure 39: Schéma d'échantillonnage de l'expérimentation <i>Botrytis cinerea</i>	62
Figure 40: Représentation du gradient d'élution de la méthode d'analyse en HPLC des polyphénols – durée : 88.1 min	66
Figure 41: Chromatogramme d'une analyse HPLC de feuilles de tomate à la longueur d'onde 330 nm.....	66
Figure 42: Représentation du gradient d'élution de la méthode d'analyse en HPLC-MS de la tomatine– durée : 20.2 min.....	67
Figure 43 : Evolution de la température (°C) et du rayonnement lumineux (W.m ⁻²) dans les deux serres – LC : serre avec [CO ₂] ambiant – HC : serre avec [CO ₂] enrichi.....	73
Figure 44 : Evolution de la concentration en CO ₂ de l'atmosphère des deux serres.	74

Figure 45 : Evolution du pH moyen des solutions au cours de la culture (de 13 JAS à 46 JAS) – HC : [CO ₂] fort – LC : [CO ₂] faible – HN : [N] fort – LN : [N] faible – mix : N=nitrate/ammonium – nit : N=nitrate – n=3	74
Figure 46: Evolution du % d'écart entre la concentration en nitrate dans les solutions mesurée avant ajustement et la concentration en nitrate consigne - HC : [CO ₂] fort – LC : [CO ₂] faible – HN : [N] fort – LN : [N] faible – mix : N=nitrate/ammonium – nit : N=nitrate – n=3.....	75
Figure 47 : Accumulation de biomasse sèche totale (g) en coordonnée logarithmique au cours de la culture – récolte à 27, 35 et 47 jours après semis - HC : [CO ₂] fort – LC : [CO ₂] faible – HN : [N] fort – LN : [N] faible – n=6	76
Figure 48: Evolution de la surface foliaire totale (cm ² par plante) en coordonnée logarithmique au cours de la culture - récolte à 27, 35 et 47 jours après semis - HC : [CO ₂] fort – LC : [CO ₂] faible – HN : [N] fort – LN : [N] faible – n=6.....	76
Figure 49 : Evolution du volume cumulé (ml) de solution de nitrate (1M) ajouté par plante durant la culture.....	78
Figure 50 : Evolution du volume cumulé (L) d'eau ajouté par plante durant la culture	78
Figure 51: Ratio C/N total des des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) en fonction des concentration en N total (mmol.g ⁻¹) à 35 JAS – les barres verticales correspondent aux écarts-types – n=3	82
Figure 52: Masse sèche (g) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les droites de régressions sont représentées pour les FED par des tirets, les FD par des tirets-points, les tiges par une ligne continue et les racines par des points – Pour des raisons de clarté, les écarts-types verticaux et horizontaux ne sont pas matérialisés – Les droites de régression ne sont tracées que lorsque la régression est significative (P < 0.05) – R correspond au coefficient de Pearson – n=3 – 0.05 > ‘*’ > 0.01 > ‘**’ > 0.001 > ‘***’	83
Figure 53: Concentrations en glucides simples (glucose + fructose) (mg.g ⁻¹ MS) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à celles de la Figure 52 – n=3	84
Figure 54: Concentrations en amidon (mg.g ⁻¹ MS) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à celles de la Figure 52 – n=3.....	85
Figure 55 : Concentrations (mg.g ⁻¹ MS) en acide chlorogénique (■), rutine (▲) et kaempferol-rutinoside (●) en fonction du ratio C/N total dans les FED (A.), les FD (B.), les tiges (C.) et les racines (D.) – Les droites de régressions sont représentées pour l'acide chlorogénique par des tirets, la rutine par des tirets-points, le kaempferol-rutinoside par une ligne continue – Pour des raisons de clarté, les écarts-types verticaux et horizontaux ne sont pas matérialisés –	

Les droites de régression ne sont tracées que lorsque la régression est significative ($P < 0.05$) – R correspond au coefficient de Pearson – R_{\log} correspond au coefficient de Pearson avec les valeurs transformées en log – $n=3$ – $0.05 > *$ – $0.01 > **$ – $0.001 > ***$ 86

Figure 56 : Concentrations en tomatine (mg.g^{-1} MS) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à celles de la Figure 52 – $n=3$ 87

Figure 57 : Concentrations en lignine (mg.g^{-1} MS) en fonction du ratio C/N total des FED (■), FD (▲), tiges (T : ●) et racines (R : ◆) à 35 jours après semis – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à celles de la Figure 52 – $n=3$ 87

Figure 58: Concentrations (mg.g^{-1} MS) en glucides simples (■), amidon (▲) et lignine (●) en fonction du ratio C/N des ressources dans les FED (A.), les FD (B.), les tiges (C.) et les racines (D.) – Les droites de régressions sont représentées pour les glucides simples par des tirets, l'amidon par des tirets-points – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à ceux de la Figure 55 - $n=3$ 90

Figure 59: Concentrations (mg.g^{-1} MS) en acide chlorogénique (■), rutine (▲), kaempferol-rutinoside (●) et tomatine (◆) en fonction du ratio C/N des ressources dans les FED (A.), les FD (B.), les tiges (C.) et les racines (D.) – Les informations concernant les droites de régression et les écarts-types sont identiques à ceux de la Figure 55 - $n=3$ 91

Figure 60 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de S HN (rouge = 100%)), en coordonnée logarithmique, des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique (acide chloro), rutine, kaempferol-rutinoside (KR), tomatine et caffeoyl putrescine dans la feuille inoculée, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te S LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te S HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. syringae* sous faible azote (S LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. syringae* sous fort azote (S HN : rouge-ligne pointillée) – $n=6$ 103

Figure 61 : Comparaison entre deux chromatogrammes UV – le trait noir représente Te S HN et le trait rouge représente S HN 104

Figure 62 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de C HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, tomatine et caffeoyl putrescine dans la tige inoculée, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te C LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te C HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. corrugata* sous faible azote (C LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. corrugata* sous fort azote (C HN : rouge-ligne pointillée) – $n=6$ 105

Figure 63 : Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes reliée à la voie de biosynthèse des phénolamides. Les molécules et les gènes étudiés sont inscrits en rouge et

vert respectivement. Le gène *PAL5* est le gène principalement exprimé chez la tomate codant pour la phénylalanine ammonia lyase (PAL : phénylalanine ammonia-lyase) - L'expression du gène *HQT* (hydroxycinnamoyl quinate transférase) est essentiel à la synthèse de l'acide chlorogénique. Le gène *F3H* (flavanone 3-hydroxylase) est impliqué dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes. L'enzyme PHT (putrescine N-hydroxycinnamoyl transférase) est essentielle à la synthèse du caffeoyl putrescine et les deux copies de gènes codant pour des *PHT* putatives chez la tomate (*SIPHT1* et *SIPHT2* ; cf paragraphe 3.4.a du chapitre 2) sont donc supposées importantes pour l'accumulation de ce composé. C4H : cinnamate 4 hydroxylase. 4CL : 4-coumarate CoA ligase. CHS : chalcone synthase. CHI : chalcone isomérase. FLS : Flavonol synthase. 3GT : flavonoïde-3-O-glucosyltransférase. RT : flavonoïde 3-O-glucoside-rhamnosyl transférase. F3'H : flavonoïde 3'-hydroxylase. C3H : p-coumaroyl ester 3-hydroxylase. HCT : hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate transférase. D'après Larbat *et al.* (2012b)..... 107

Figure 64 : Représentation radar des valeurs en quantité relative des niveaux d'expressions de gènes en coordonnée logarithmique dans la feuille inoculée, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te S LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te S HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. syringae* sous faible azote (S LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. syringae* sous fort azote (S HN : rouge-ligne pointillée) – Pour des raisons de clarté, les quantités relatives minimum et maximum ne sont pas indiquées sur la représentation, mais sont consignées en Annexe 5 108

Figure 65 : Représentation radar des valeurs en quantité relative des niveaux d'expressions de gènes en coordonnée logarithmique, dans la zone inoculée, 24h (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te C LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te C HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. corrugata* sous faible azote (C LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. corrugata* sous fort azote (C HN : rouge-ligne pointillée) – Pour des raisons de clarté, les quantités relatives minimum et maximum ne sont pas indiquées sur la représentation, mais sont consignées en Annexe 6 109

Figure 66 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de S HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside (KR), tomatine et caffeoyl putrescine dans la feuille « systémique », 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te S LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te S HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. syringae* sous faible azote (S LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. syringae* sous fort azote (S HN : rouge-ligne pointillée) – n=6 112

Figure 67 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de S HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, tomatine et caffeoyl-putrescine dans les tiges, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.). Les traitements sont identiques à ceux décrits en Figure 66 – n=6 ... 113

- Figure 68 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de C HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside (KR), tomatine et caffeoyl putrescine dans la feuille « systémique », 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.), en fonction des traitements : plantes témoins sous faible azote (Te C LN : vert clair-ligne tiret), plantes témoins sous fort azote (Te C HN : vert foncé-ligne continu), plantes inoculées par *P. corrugata* sous faible azote (C LN : orange-ligne tiret-point) et plantes inoculées par *P. corrugata* sous fort azote (C HN : rouge-ligne pointillée) – n=6..... 115
- Figure 69 : Représentation radar des valeurs (en % par rapport à celles de S HN (rouge = 100%)) des concentrations en glucose, fructose, saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine, tomatine et caffeoyl putrescine dans les tiges, 24h après inoculation (A.) et 12 jours après inoculation (B.). Les traitements sont identiques à ceux décrits en Figure 68 – n=6... 116
- Figure 70 : Photographies d'une feuille inoculée par de l'eau 24h (A.) et 12 jours (C.) après inoculation et d'une feuille inoculée par une suspension de *P. syringae* 24h (B.) et 12 jours (D.) après inoculation 117
- Figure 71 : Photographies, 12 jours après inoculation, d'une portion de tige inoculée par de l'eau (A.), par une suspension de *P. corrugata* sous LN (B.) et par une suspension de *P. corrugata* sous HN (C.)..... 118
- Figure 72 : Schéma de synthèse des réponses locale et systémique de la plante à l'inoculation de *P. syringae* 24h et 12 jours après inoculation – ac : acide chlorogénique – KR : kaempferol-rutinoside - monosaccharides = glucose + fructose - [x] : concentration en x ... 120
- Figure 73 : Schéma de synthèse des réponses locale et systémique de la plante à l'inoculation de *P. corrugata* 24h et 12 jours après inoculation - monosaccharides = glucose + fructose - [x] : concentration en x 120
- Figure 74 : Représentation radar des concentrations (mg.g⁻¹ MS) en glucose, fructose, saccharose et amidon dans la feuille témoin (vert – trait plein), présentant des petites galeries (orange – tiret deux points tiret), des grosses galeries (noir – pointillés), avec une larve (bleu – tirets) ou une puppe (violet – tiret point tiret) des plantes poussant sous une faible disponibilité en azote (LN : A.) ou une forte disponibilité en azote (HN : B.)..... 123
- Figure 75 : Représentation radar en coordonnées logarithmiques des concentrations (mg.g⁻¹ MS) en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside (KR) et tomatine dans la feuille témoin (vert – trait plein), présentant des petites galeries (orange – tiret deux points tiret), des grandes galeries (noir – pointillés), avec une larve (bleu – tirets) ou une puppe (violet – tiret point tiret) des plantes poussant sous une faible disponibilité en azote (LN : A.) ou une forte disponibilité en azote (HN : B.) 123
- Figure 76 : Schéma de synthèse de l'effet de l'inoculation de *P. syringae* sur les concentrations en composés phénoliques étudiés en relation avec les expressions des gènes clés de leurs voies de biosynthèse à R1 (= 24h après inoculation) et R2 (= 12 jours après inoculation) – les gènes et métabolites en rouge sont réprimés, ceux en vert sont induits 127

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différents groupes de composés phénoliques. D'après Macheix <i>et al.</i> (2005)....	12
Tableau 2: Composition des solutions nutritives selon la concentration en azote. Masse des sels en g pour 80 litres de solution.	49
Tableau 3: Composition de la solution mère d'oligo-éléments. Masses des sels en g pour 1 litre de solution d'oligo-éléments. Ajout de 0.3 ml de solution d'oligo-éléments par litre de solution nutritive.	50
Tableau 4: Composition des solutions nutritives selon la concentration en azote. Masses de sels en g nécessaires pour 1 litre de solution.	55
Tableau 5 : Récapitulatif des facteurs appliqués, du nombre de répétition, des dates de récoltes et des organes récoltés lors de l'expérimentation à l'INRA de Champenoux	73
Tableau 6 : Taux d'assimilation nette de CO ₂ et taux de transpiration des feuilles jeunes et feuilles développées à 45 jours après semis – Les chiffres représentent : moyenne (± écart-type) – n=3	77
Tableau 7: Concentration en azote [N] et carbone [C] total en mmol.g ⁻¹ MS pour les différents traitements à 27 (A.), 35 (B.) et 47 (C.) jours après semis – Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) – n=3 – F : Feuilles – FED : Feuilles En Développement – FD : Feuilles Développées – T : Tiges – R : Racines.....	80
Tableau 8: Ratios C/N totale, des structures (C/N _s) et des ressources (C/N _r) pour les différents traitements à 35 jours après semis – Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) – n=3 – F : Feuilles – FED : Feuilles En Développement – FD : Feuilles développées – T : Tiges – R : Racines.....	89
Tableau 9: Matrice de corrélation entre les ratios C/N total et des structures (C/N _s) et la concentration des différents métabolites étudiés dans les quatre organes à 35 JAS – les chiffres correspondent au R de Pearson – (2) : variables transformées en log - 0.05 > '*' > 0.01 > '**' > 0.001 > '***'	89
Tableau 10 : Récapitulatif des facteurs appliqués, du nombre de répétition, des dates de récoltes et des organes récoltés lors des expérimentations sur <i>Tuta absoluta</i> et sur <i>Pseudomonas syringae</i> et <i>P. corrugata</i>	98
Tableau 11 : Masses sèches aériennes (g), surfaces foliaires (cm ²) de la feuille « systémique » (FS) et de la feuille inoculée (Fi) des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec <i>P. syringae</i> (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h (R1) et 12 jours (R2) après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6	99
Tableau 12 : Masses sèches aériennes (g), surfaces foliaires (cm ²) de la feuille « systémique » (FS) des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec <i>P. corrugata</i> (C) poussant sous LN ou HN	

mesurées 24h (R1) et 12 jours (R2) après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6	100
Tableau 13 : Taux de transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), taux d'assimilation nette de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et taux de respiration à l'obscurité ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec <i>P. syringae</i> (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6.....	100
Tableau 14 : Taux de transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), taux d'assimilation nette de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et taux de respiration à l'obscurité ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec <i>P. corrugata</i> (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6.....	101
Tableau 15 : Ratio C/N de la feuille inoculée des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec <i>P. syringae</i> (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6.....	101
Tableau 16 : Ratio C/N de la zone de tige inoculée des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec <i>P. corrugata</i> (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6.....	102
Tableau 17 : Concentrations (mg.g^{-1} MS) en glucose, fructose, amidon, acide chlorogénique et caffeoyl putrescine dans la feuille inoculée des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec <i>P. syringae</i> (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 – Les valeurs en saccharose, rutine et tomatine sont consignées en Annexe 3.....	104
Tableau 18 : Concentrations (mg.g^{-1} MS) en glucose, fructose, saccharose, rutine et tomatine dans la tige inoculée des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec <i>P. corrugata</i> (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 – Les valeurs en amidon, acide chlorogénique et caffeoyl putrescine sont consignées en Annexe 4.....	106
Tableau 19 : Ratio C/N de la feuille « systémique » et des tiges des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec <i>P. syringae</i> (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6.....	110
Tableau 20 : Ratio C/N de la feuille « systémique » et des tiges des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec <i>P. corrugata</i> (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6.....	111
Tableau 21 : Concentrations (mg.g^{-1} MS) en saccharose, amidon, acide chlorogénique, rutine et caffeoyl-putrescine dans la feuille « systémique » des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec <i>P. syringae</i> (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 – Les valeurs en glucose, fructose, tomatine et kaempferol-rutinoside sont consignées en Annexe 7.....	112

Tableau 22 : Concentrations (mg.g ⁻¹ MS) en glucose, fructose, amidon, rutine et cafféoyl putrescine dans les tiges des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec <i>P. syringae</i> (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 – Les valeurs en saccharose, acide chlorogénique et tomatine sont consignées en Annexe 8.....	114
Tableau 23 : Concentrations (mg.g ⁻¹ MS) en glucose, fructose, acide chlorogénique et cafféoyl putrescine dans la feuille « systémique » des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec <i>P. corrugata</i> (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 – Les valeurs en saccharose, amidon, rutine, tomatine et kaempferol-rutinoside sont consignées en Annexe 9.....	115
Tableau 24 : Concentrations (mg.g ⁻¹ MS) en glucose, fructose, acide chlorogénique et cafféoyl putrescine dans les tiges des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec <i>P. corrugata</i> (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6 – Les valeurs en saccharose, amidon, rutine et tomatine sont consignées en Annexe 10.....	117
Tableau 25 : Surfaces des nécroses (cm ²) dues à l'infiltration d'eau (Te S) ou d'une suspension de <i>P. syringae</i> (S) dans la feuille inoculée de plantes poussant sous LN ou HN, mesurées 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6.....	118
Tableau 26 : Surfaces des nécroses (cm ²) dues à l'infiltration d'eau (Te C) ou d'une suspension de <i>P. corrugata</i> (C) au centre de la tige inoculée de plantes poussant sous LN ou HN, mesurées 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6	119
Tableau 27 : Masses sèches aériennes (g) et surfaces foliaires (cm ²) de la feuille inoculée et de la feuille « systémique » des plantes témoins, présentant des petites galeries, présentant des grandes galeries, avec une larve ou une puppe de <i>Tuta absoluta</i> poussant sous LN ou HN mesurées 16 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) – Les nombres entre parenthèse (n;n) suivant le stade de développement de <i>Tuta</i> représentent respectivement le nombre de plantes pour chaque traitement (nombre de plantes sous LN ; nombre de plantes sous HN)	121
Tableau 28 : Ratio C/N de la feuille inoculée des plantes témoins, présentant des petites galeries, présentant des grandes galeries, avec une larve ou une puppe de <i>Tuta absoluta</i> poussant sous LN ou HN mesurées 16 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) – le nombre de plantes pour chaque traitement (nombre de plantes sous LN ; nombre de plantes sous HN) est identique à celui du Tableau 27	122
Tableau 29 : Masses (mg) des larves et des pupes de <i>Tuta absoluta</i> et nombre d'individus sous forme larve et puppe, mesurées à la récolte, 16 jours après le dépôt des œufs sur des plantes poussant sous LN ou HN - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - Données acquises par N. Desneux (INRA Sophia-Antipolis).....	124

Tableau 30 : Surfaces (cm²) des galeries créées par les larves de *Tuta absoluta* mesurées à la récolte, 16 jours après le dépôt des œufs sur des plantes poussant sous LN ou HN - Les valeurs correspondent à : moyenne (\pm écart-type) – Les nombres entre parenthèse (n;n) suivant le stade de développement de *T. absoluta* représentent respectivement le nombre de plantes pour chaque traitement (nombre de plantes sous LN ; nombre de plantes sous HN).....
..... 124

ANNEXES

Annexe 1 : Choix de la méthode d'extraction combinée des polyphénols et glycoalcaloïdes

La méthode d'extraction classiquement utilisée au laboratoire a été mise au point par Bénard (2009). Cette méthode est spécifique pour l'extraction des polyphénols et utilise de l'éthanol 70% comme solvant d'extraction. L'extrait (50 mg de poudre + 50 µl de taxifoline + 2 ml d'éthanol 70%) est broyé pendant 1 min à l'ultra-turax et agité pendant 30 min au thermomixeur à 100 g. Après centrifugation, l'extrait est évaporé au SpeedVac[®], solubilisé dans 1 ml de méthanol 70% pour être analysé en LC-MS.

Nous avons voulu adapter la méthode pour extraire simultanément les polyphénols et le glycoalcaloïde tomatine, pour des économies de quantité d'échantillons et de temps.

- Protocoles 1^{er} test :

Nous avons testé trois méthodes d'extraction sur deux échantillons (Ech1 et Ech2) de feuilles lyophilisées et broyées :

- La **méthode A** est adaptée de celle de Cataldi *et al.* (2005) spécifique aux glycoalcaloïdes utilisant de l'acide acétique 1%. L'extrait (50 mg de poudre + 50 µl de taxifoline + 1 ml d'acide acétique 1%) est agité pendant 2h au thermomixeur à 100 g et centrifugé 20 min à 1500 g. Cet enchaînement d'opérations est répété une seconde fois sur le culot. Après évaporation au SpeedVac[®], l'extrait est solubilisé dans 1 ml de méthanol 70%.

- La **méthode B** est la méthode classique à l'éthanol 70% expliquée précédemment.

- La **méthode C** est adaptée de celle de Keukens *et al.* (1994), spécifique aux glycoalcaloïdes, utilisant du méthanol 40% et des cartouches Sep-pack (500 mg/6ml, Strata C18-E, Phenomenex). L'extrait (50 mg de poudre + 50 µl de taxifoline + 1 ml de méthanol 40%) est broyé 1 min à l'ultra-turax et centrifugé 10 min à 2400 g. Cet enchaînement d'opérations est répété une seconde fois sur le culot. Ensuite, l'extrait est filtré à 0.45 µm et ajusté à 20% méthanol (v/v). La cartouche est pré-conditionnée avec 5 ml de méthanol et 5 ml d'eau ultra-pure. La solution est ensuite appliquée sur la cartouche. L'éluat est récupéré. Ensuite, la cartouche est rincée avec 5 ml de méthanol 20%, la solution de rinçage est récupérée. Trois éluations sont réalisées (2x5 ml de méthanol 80% et 5 ml de méthanol pur). Tous les éluats sont récupérés séparément, évaporés au SpeedVac[®] et solubilisés ensuite dans 1 ml de méthanol 70%.

L'analyse des polyphénols est réalisée en LC-MS. Nous avons utilisé la méthode classique du laboratoire : 20 µl d'extrait non dilué sont séparés par HPLC-MS (LTQ-MS, Thermoscientific) avec une colonne C18 (4x250 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Allemagne). La phase mobile consiste en 0.1% d'acide formique dans de l'eau ultra-pure (A) et 0.1% d'acide formique dans du méthanol (B). Le gradient (10% B 2 min ; 10% à 50% B en 50 min ; 50 % à 90% B en 20 min ; 90% B pendant 5 min ; 90% à 10% B en 10 sec ; 10%B pendant 10 min) est élué à 0.5 ml.min⁻¹. La détection est réalisée par un détecteur à barrette de diodes (200-400 nm). Les aires de pics de l'acide chlorogénique et de la rutine sont mesurées à la longueur d'onde 330 nm. La taxifoline est l'étalon interne : un flavonoïde introduit en

concentration connue avant l'extraction. Il permet de déterminer l'efficacité d'extraction des polyphénols.

L'analyse de la tomatine est réalisée en LC-MS. Vingt microlitres d'extrait dilué 50 fois, sont séparés avec une colonne C18 (150x2.1 mm, 5µm, Alltech Associates Inc.). La phase mobile est identique à celle de l'analyse des polyphénols. La méthode est isocratique avec 65% B pendant 20 min puis 100% B pendant 10 min. La rééquilibration de la colonne se fait pendant 10 min à 65% B. La tomatine est quantifiée en mesurant l'aire de pic à m/z 529 suivi en mode positif.

- Résultats 1^{er} test :

Les méthodes d'extraction B et C sont plus efficaces que la méthode A pour extraire la tomatine, et ceci pour les deux échantillons testés (Figure 1).

En effet, avec la méthode B, une augmentation de 35% et 16% d'aire de pic est observée par rapport à la méthode A, pour les échantillons Ech1 et Ech2 respectivement. Avec la méthode C, une augmentation de 56% (pour Ech1) et 40% (pour Ech2) d'aire de pic est obtenue par rapport à la méthode A. Ainsi, la méthode C au méthanol 40% est plus efficace pour extraire les glycoalcaloïdes que la méthode B à l'éthanol 70%.

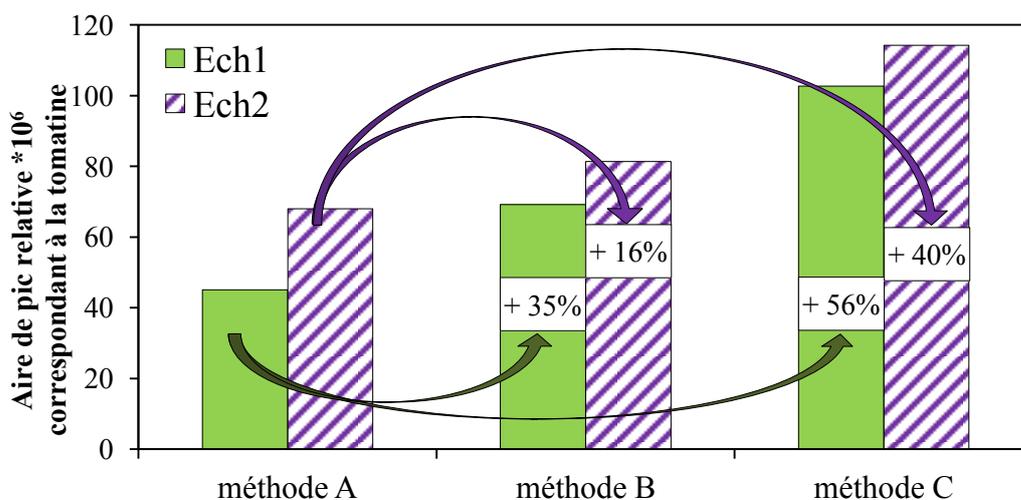


Figure 1 : Quantité de tomatine en aire de pic relative obtenue avec les trois méthodes d'extraction A, B et C et sur deux échantillons de feuilles lyophilisées et broyées – Les pourcentages représentent les augmentations d'aire de pic entre les différentes méthodes.

Concernant l'extraction des polyphénols, la méthode A à l'acide acétique 1% n'est pas du tout efficace puisque nous retrouvons seulement le pic de rutine sur le chromatogramme. L'acide chlorogénique et la taxifoline n'apparaissent pas (Figure 2). Ainsi, cette méthode d'extraction est abandonnée.

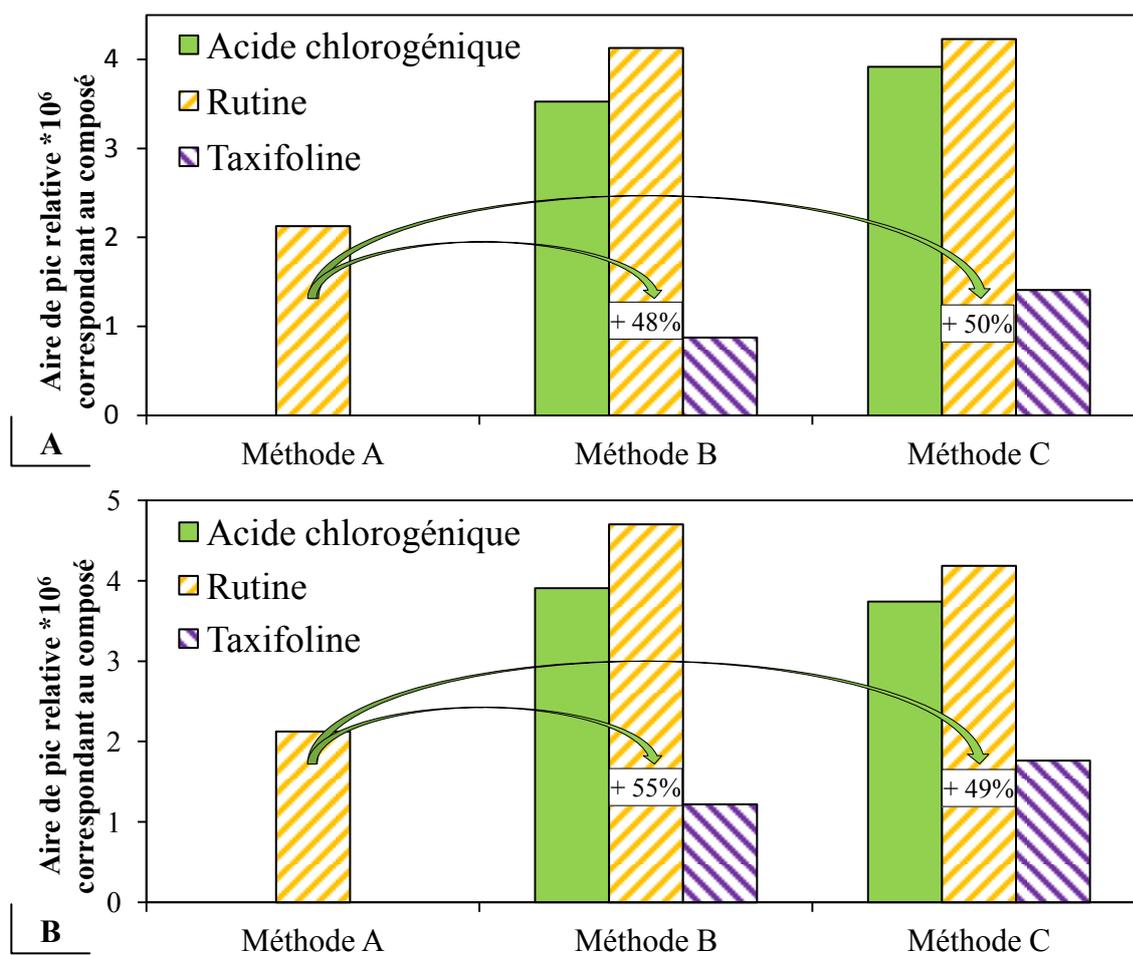


Figure 2: Quantité d'acide chlorogénique (vert), rutine (orange hachuré droite) et taxifoline (violet hachuré gauche) en aire de pic relative obtenue avec les trois méthodes d'extraction A, B et C sur les échantillons Ech1 (A) et Ech2 (B) – Les pourcentages représentent les augmentations d'aire de pic entre les différentes méthodes.

Entre les méthodes B à l'éthanol 70% et C au méthanol 40%, le gain de % en aire de pic par rapport à la méthode A est quasiment identique (environ 50% d'augmentation pour la rutine).

Ces résultats nous ont conduits à réaliser d'autres tests d'extraction. En effet, la méthode C apparaît la plus appropriée pour extraire simultanément les glycoalcaloïdes et les polyphénols. Cette méthode extrait quasiment la même quantité de polyphénols mais une plus grande quantité de tomatine. Néanmoins, cela peut-être dû au solvant d'extraction (méthanol) qui pourrait être plus efficace plutôt qu'à la méthode d'extraction. Ensuite, lors de ces tests, nous avons remarqué que l'utilisation de cartouche de purification C18 entraînait des coûts (monétaire et temps) supplémentaires pour plusieurs centaines d'échantillons à analyser. Nous avons donc testé l'extraction sans cartouche.

- Protocoles 2^{ième} test :

La méthode d'extraction C est testée sans cartouche avec comme solvant d'extraction du méthanol 40%, 50% ou 60%, et de l'éthanol 60%. La même méthode est testée avec cartouche et du méthanol 60% comme solvant d'extraction.

La méthode B est testée avec comme solvant d'extraction du méthanol 40%.

- Résultats 2^{ème} test :

L'utilisation d'un solvant contenant un % de méthanol de plus en plus élevé avec la méthode C augmente la quantité de tomatine extraite (Figure 3). La différence est significative en utilisant du méthanol 50% plutôt que du 40%. Entre le méthanol 50% et 60%, la différence est non significative.

Pour l'extraction des polyphénols (Figure 4), les résultats sont quasiment identiques à ceux de la tomatine. L'extraction avec le méthanol 50% et 60% augmente la quantité de polyphénols extraite. Même si les différences entre l'extraction au méthanol 50% et 60% ne sont pas significatives, elles sont quand même visibles. Nous avons donc adopté le solvant d'extraction le moins dilué.

Nous avons vu plus haut que la méthode C (Méthanol) semblait plus efficace que la B (Ethanol). Pour les comparer, nous avons réalisé la méthode d'extraction B avec comme solvant d'extraction le méthanol 40%. Nous observons une très bonne efficacité concernant l'extraction de la tomatine (Figure 3). Ce qui montre que le méthanol semble être le solvant le plus efficace pour extraire les glycoalcaloïdes. Par contre, nous obtenons la plus faible efficacité d'extraction pour les polyphénols (Figure 4) surtout pour l'acide chlorogénique. La méthode B n'est donc pas appropriée pour extraire simultanément les deux types de composés.

Le méthanol est un produit toxique. Il est donc intéressant de tester la méthode C avec un solvant moins dangereux, l'éthanol. Nous remarquons que l'éthanol 60% a un très faible pouvoir d'extraction de la tomatine (Figure 3) et celui des polyphénols est plus faible que pour le méthanol 60%.

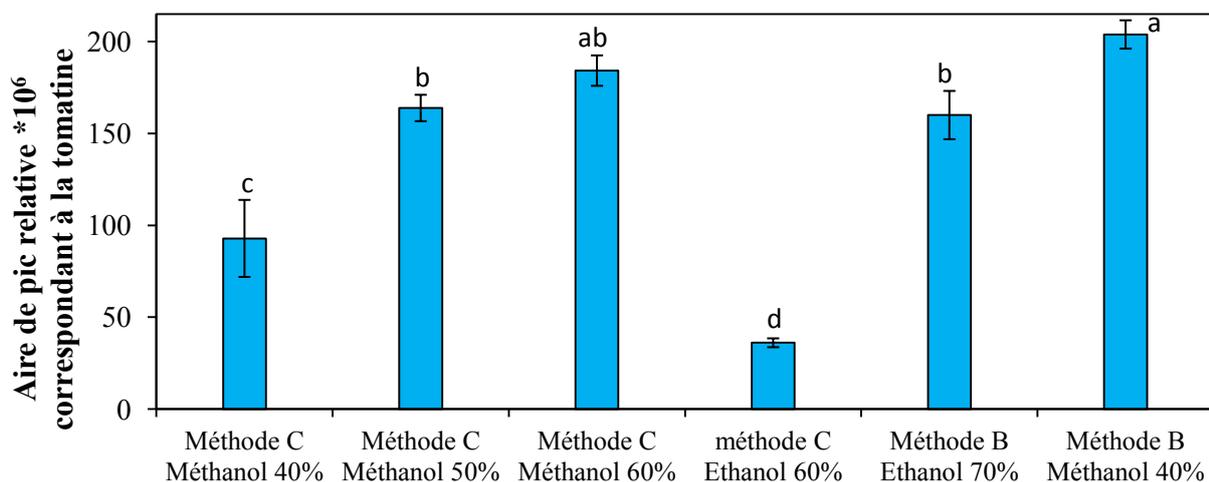


Figure 3: Quantité de tomatine en aire de pic relative *10⁶ obtenue avec les méthodes C ou B et avec différents solvants d'extraction – différence significative (p<0.05) entre les méthodes lorsque les valeurs moyennes sont affectées de lettres différentes (ANOVA) – n=3

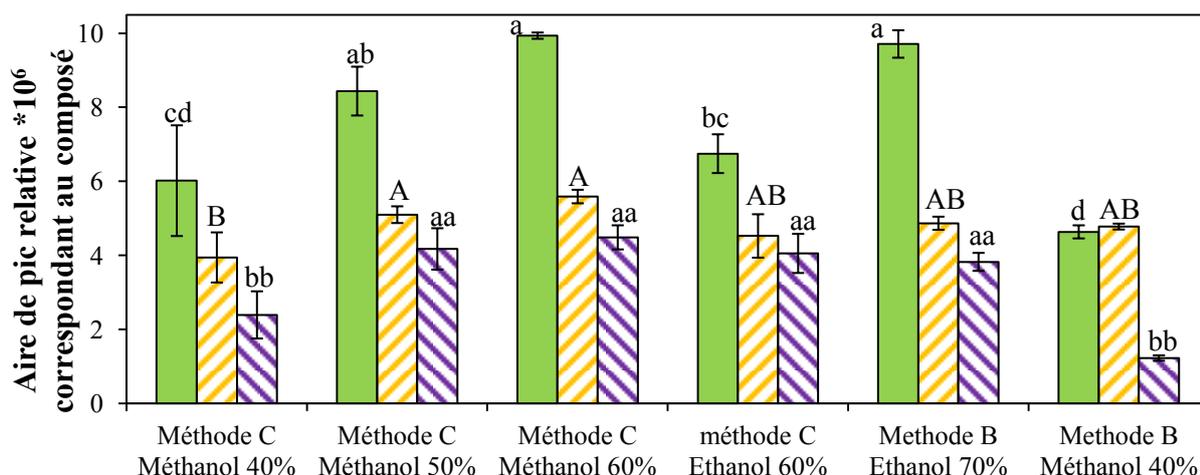


Figure 4 : Quantité d'acide chlorogénique (vert), rutine (orange hachuré droite) et taxifoline (violet hachuré gauche) en aire de pic relative obtenue avec les méthodes B et C et avec différents solvants d'extraction – Différence significative ($p < 0.05$) entre les méthodes lorsque les valeurs moyennes sont affectées de lettres différentes (ANOVA) – $n=3$

Ces tests ayant été réalisés sans cartouche de purification pour la méthode C, il est nécessaire de tester si l'utilisation de cartouche augmente la quantité de composés extraits. Pour cela, la méthode C avec du méthanol 60% est testée avec et sans cartouche. On observe une augmentation de la quantité de tomatine extraite avec cartouche (Figure 5.A.) alors que les quantités extraites de tous les polyphénols diminuent toutes lorsque la cartouche est utilisée (Figure 5.B.). Ceci peut être dû à la perte d'une certaine quantité de polyphénols non éluée avec les trois éluions. Il faudrait réaliser plus de 2 éluions avec le méthanol 80% pour être sûr de récupérer la totalité des polyphénols de l'échantillon. Ce qui semble non compatible avec le nombre important d'échantillons à extraire. De plus, le fait de ne pas réaliser cette méthode en routine nous oblige à éluer manuellement sous pression avec un piston de seringue, ce qui peut créer des différences entre les échantillons et donc conduire à une variabilité de manipulation importante. Pour la suite, nous n'utiliserons pas de cartouches de purification mais seulement une filtration à $0.45 \mu\text{m}$ préalable à l'analyse en HPLC.

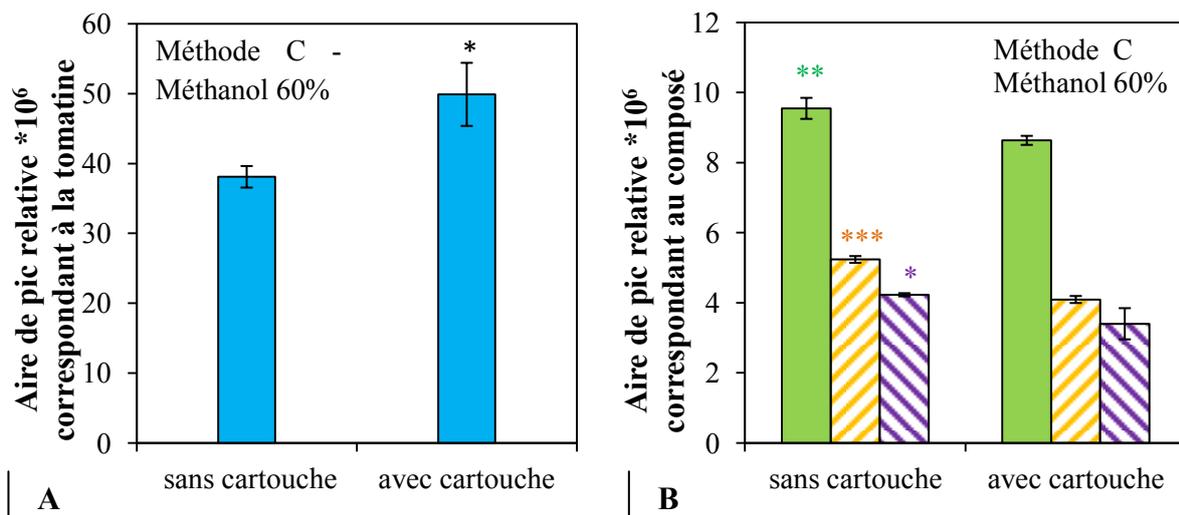
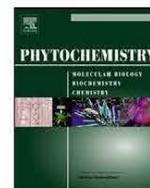
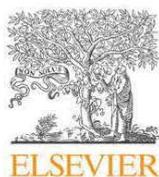


Figure 5 : A. Quantité de tomatine en aire de pic relative *10⁶ obtenue avec la méthode C – Méthanol 60% en utilisant ou non la cartouche de purification. B. Quantité d'acide chlorogénique (vert), rutine (orange hachuré droite) et taxifoline (violet hachuré gauche) en aire de pic relative *10⁶ obtenue avec la méthode C – Méthanol 60% en utilisant ou non la cartouche de purification. Les étoiles correspondent à une différence significative ($p < 0.05$) sur une ANOVA - $n=3$

- Conclusions :

La méthode C est choisie comme méthode d'extraction avec comme solvant le méthanol 60%.

Annexe 2 : Article « Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato ? » publié dans *Phytochemistry*



Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato?

Mathilde Royer^{a,b}, Romain Larbat^{a,b}, Jacques Le Bot^c, Stéphane Adamowicz^c, Christophe Robin^{a,b,*}

^aINRA UMR 1121 "Agronomie & Environnement" Nancy-Colmar, BP 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^bUniversité de Lorraine UMR 1121 "Agronomie & Environnement" Nancy-Colmar, BP 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

^cINRA UR 1115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, F84000 Avignon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2012

Received in revised form 29 November 2012

Available online 9 January 2013

Keywords:

Solanum lycopersicum

Tomato

C:N ratios

Phenolics

Chlorogenic acid

Rutin

Kaempferol-rutinoside

Glycoalkaloids

Tomatine

Lignin

ABSTRACT

Plant growth and defence are both fuelled by compounds synthesized from a common pool of carbon and nitrogen, implying the existence of a competition for carbon and nitrogen allocation to both metabolisms.

The ratio of carbon to nitrogen (C:N) of an organ is often regarded as a convenient indicator of growth and quality. The purpose of this work was to assess whether or not it is possible to extend its use to characterize the trade-off between growth and defence processes. Therefore, we calculated C:N ratios in the pool of resources and in the total plant, and correlated them to the concentrations of diverse compounds of the primary and secondary metabolisms in young tomatoes.

Plants were grown hydroponically at N availabilities either limiting (0.1 mM) or not (7 mM) for growth in two glasshouses maintained either under ambient or enriched (700 vpm) air CO₂. These conditions yielded a large array of C:N in fully developed leaves, developing leaves, stem and roots, sampled 27, 35 and 47 days after sowing. Growth parameters and tissue concentrations of primary metabolites (carbohydrates, starch), defence-related compounds (polyphenols, glycoalkaloids), lignin, nitrate, ammonium, C and N were analyzed. Net CO₂ exchange rate was also measured at the last sampling date.

Low N limited plant growth more than photosynthesis. The C:N in the resource pool was far higher than the total C:N. Starch was the most responsive compound, attaining high concentration under high C:N, whereas lignin remained stable. Chlorogenic acid, rutin, kaempferol-rutinoside and tomatine concentrations correlated positively to C:N. The same patterns were observed for most organs and molecules, except soluble carbohydrates in fully developed leaves whose concentration was not influenced. Among the organs, developing leaves showed the highest concentrations of secondary compounds and were the most responsive to C:N variations. Neither the biochemical nature of the compounds (C-based or N-containing metabolites) nor the calculation mode of C:N, influenced the patterns observed.

Within the range of N availabilities considered (up to N limitation but not deficiency), the C:N can be considered as a good indicator of the secondary compounds concentrations in organs, especially for those involved in the chemical defence.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: C:N, ratio of carbon to nitrogen; C, carbon; N, nitrogen; CNB, carbon-nutrient balance; ODT, optimal defence theory; GDB, growth-differentiation balance; PCM, protein competition model; C:N_r, resource C:N ratio; C:N_t, total C:N ratio; CGA, chlorogenic acid; KR, kaempferol-rutinoside; dry wt, dry weight; LA, leaf area; N_{nit}, nitrate alone; N_{mix}, nitrate-ammonium mixture; HC, elevated CO₂; LC, ambient CO₂; HN, high N; LN, limiting N; [X], concentration of X; A_{net}, CO₂ exchange rate; das, days after sowing.

* Corresponding author. Address: UMR 1121 Agronomie Environnement Nancy-Colmar, Université de Lorraine – INRA, ENSAIA, 2 Av. Forêt de Haye, F-54505 Vandœuvre, France.

E-mail addresses: mathilde.royer@univ-lorraine.fr (M. Royer), romain.larbat@univ-lorraine.fr (R. Larbat), jacques.lebot@avignon.inra.fr (J. Le Bot), stephane.adamowicz@univ-lorraine.fr (S. Adamowicz), christophe.robin@univ-lorraine.fr (C. Robin).

0031-9422/\$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.12.003>

1. Introduction

In their environment, plants frequently experience conditions such as low nutrient availability or pest and disease attacks, that limit their growth. During evolution, plants have developed efficient resource acquisition systems and defence processes that ensure their growth, their development and their survival in the ecosystems. At the metabolic level, however, growth and defence seem antagonistic. The former results from the primary metabolism that acquires and transforms resources into new tissues, while the latter rests on the secondary metabolism that produces a wide diversity of defence-related molecules (Croteau et al., 2000; Stamp, 2004). The secondary metabolism involves compounds that are not

necessarily vital to plants, but useful for their adaptation to the environment. However, this separation between metabolisms is not clear-cut. Furthermore, secondary and primary metabolites are synthesized from the same resources, mostly C, acquired from the environment. Thus plants face an endless dilemma between growth and defence (Mittelstrass et al., 2006). This is why productivity is viewed as the result of a trade-off between resource allocation to growth and to defence processes (Mittelstrass et al., 2006).

Four main hypotheses have been put forward to conceptualize this trade-off: the carbon–nutrient balance (CNB) (Bryant et al., 1983; Tuomi, 1992), the optimal defence theory (ODT) (McKey, 1974, 1979), the protein competition model (PCM) (Jones and Hartley, 1999), and the growth–differentiation balance (GDB) (Loomis, 1932; Herms and Mattson, 1992; Herms, 2002). They form a conceptual framework for the functional ecology of plant defence suggesting that plants make an effective use of costly *versus* beneficial investments towards defence *versus* growth processes. This trade-off is mainly conditioned by the relative availability of resources such as N and C (Herms and Mattson, 1992). The C:N ratio of the biomass is considered as a good indicator of this relative availability. It has been used to diagnose the growth status of plant organs (Grechi et al., 2007; Minden and Kleyer, 2011; Peng et al., 2011) and as a plant trait to assess the impact of the environment such as elevated CO₂ concentration (Lam et al., 2012; Sardans and Penuelas, 2012) or agronomic factors such as defoliation (Bazot et al., 2005) on the quality of plant tissues. In this paper, we envisage to extend its use to the diagnosis of the share of resources between growth and chemical defence. Very few studies considered the plant or organ C:N status as an indicator of chemical defence (Hoffland et al., 2000; Ibrahim et al., 2011) and none as a predictor of the balance between metabolisms. C:N is worth to be tested as an indicator of the trade-off between growth and secondary metabolism.

The use of the C:N ratio has been criticized because it is calculated from the total C and N contents (Stitt and Krapp, 1999; Fritz et al., 2006). Indeed, they are the mere concentration of various C and N forms making up compartments of different physiological nature, either resources (starch, nitrate, etc.) or metabolic (proteins) and non-metabolic (lignin) structures. Therefore, in this paper, we refined the C:N by considering these forms separately or

together, thus defining two distinct C:N ratios: resource (C:N_r) or total (C:N_t).

We assess here whether or not the CN status at organ level can describe and predict the partitioning of resources to defence compounds. For this purpose, we correlated both C:N ratios to the concentrations of diverse primary metabolites (carbohydrates), lignin and some defence-related chemicals, either C-based (phenolic acids and flavonoids) or C&N-based (glycoalkaloids).

The primary metabolism was assessed by the dry weight and non-structural carbohydrate (soluble sugars and starch) accumulations. The secondary metabolism was characterized by the accumulation of a major glycoalkaloid in tomato (tomatine) and of soluble (chlorogenic acid, CGA; rutin and kaempferol-rutinoside, KR) and insoluble phenolics (lignin). These soluble secondary metabolites were chosen because they have been cited as typical phytoanticipins in tomato (Van Etten et al., 1994; Ruelas et al., 2006). Although not involved in chemical defence, lignin was also quantified because it is an end-product of the phenylpropanoid pathway in which flows a significant part of C. Moreover, lignin contributes to plant defence passively as a physical barrier for pests.

A first subsidiary objective was to investigate the within-plant variation of this relationship between CN status and resource allocation. Variations of quality/composition of biomass at a small spatial scale (i.e. organ scale) may influence host selection and subsequent success/failure of insect herbivores (Zangerl and Berenbaum, 1993) or other pests.

Our experimental strategy was to induce a wide range of C:N in young tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.). They were grown hydroponically at two contrasting levels of N and CO₂ availabilities. The availability of both nutrient resources is commonly controlled by tomato growers. Furthermore, two forms of N nutrition (NO₃ alone *versus* a NO₃/NH₄ mixture) were utilized to extend the range of C:N ratios. Thus, a second subsidiary objective was to assess whether or not the addition of ammonium in nutrient solutions can modify the concentration of secondary compounds. Indeed, the forms of N nutrition change markedly the non-structural carbohydrate content in tomato (Horchani et al., 2010) but information lacks on a putative effect of ammonium on secondary metabolites of tomato and is scarce for other plants (Graham, 2002).

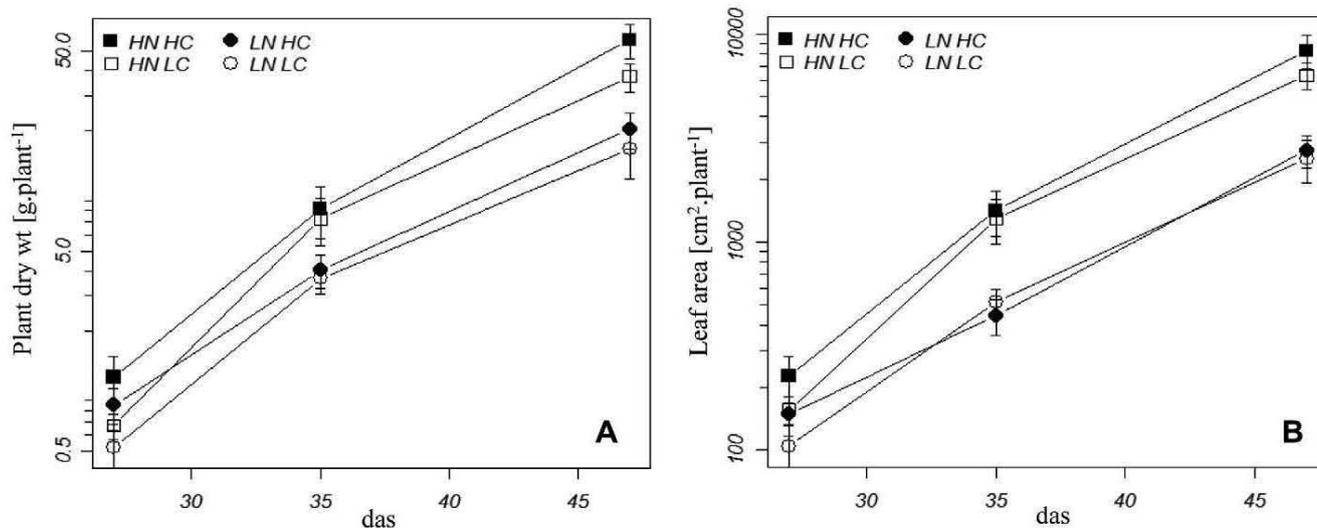


Fig. 1. Dry mass accumulation (A) in the tomato plants and total leaf area (LA) (B) over the three sampling times: 27, 35 and 47 days after sowing (das). HN: high [N], LN: low [N], HC: high [CO₂], LC: low [CO₂], nit: N provided as pure NO₃, mix: N provided as a NO₃/NH₄ mixture symbols are the means of three replicates and 2 N form treatments (nit and mix) that were pooled because N form was not significant. Vertical bars denote SE, n = 6.

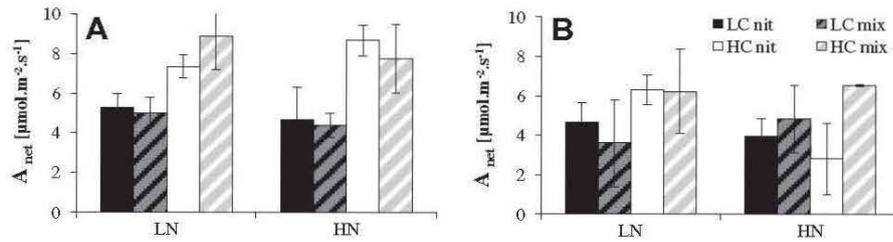


Fig. 2. Net CO₂ assimilation rate (A_{net} , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) of developing leaves (A) and fully developed leaves (B) at 47 das (days after sowing). Vertical bars denote SE, $n = 3$.

2. Results

2.1. CO₂ and N treatments affected growth and C:N ratios

During growth, the plant dry wt (Fig. 1A) and the leaf area per plant (LA, Fig. 1B) increased by around two orders of magnitude. At any sampling date, dry wt and LA were not significantly changed by the N forms (nitrate alone, N_{nit} or nitrate-ammonium mixture, N_{mix}) in solution and therefore N forms were pooled in Fig. 1A and B. At the vegetative stage (27 das), dry wt was significantly increased by elevated CO₂ (HC, **) and high N (HN, *) (Fig. 1A). At flower buds appearance (35 das), the positive effect of N was amplified (***), whereas CO₂ effect was not significant (Fig. 1A). At flowering (47 das), dry wt increased under HN (***) and the effect of [CO₂] correlated to that of [N]. Indeed, the CO₂ effect was higher under HN than under LN (Fig. 1A). LA followed roughly the same patterns than dry wt (Fig. 1B). The net CO₂ assimilation

rate (A_{net}) measured 47 das responded to [CO₂] (* in developing leaves) but was not or little affected by N concentration and form (Fig. 2). Developed leaves had lower A_{net} (**) than developing leaves (Fig. 2).

Fig. 3 shows C:N_t and C:N_r at 35 das, when they were the most affected by treatments. In all organs, the changes in C:N ratios were driven more by the impacts of CO₂ and N treatments on [N] than on [C], because the latter was little affected by the treatments (not shown). As an example, developed leaves [C] ranged from 37% to 40.3% dry wt, while [N] ranged from 2.4% (in HC-LN_{mix}) to 6.4% dry wt (in LC-HN_{mix}). In all organs, the highest C:N was obtained in HC-LN_{mix}, whereas the lowest C:N ratio was obtained at various C and N availabilities depending on the organs (not shown). In all organs, C:N_r was much more variable with treatments than C:N_t (Fig. 3A–D versus 3E–H). For instance, in developed leaves, C:N_r ranged from 6 to 300 (Fig. 3F) whilst C:N_t ranged from 7 to 19 (Fig. 3B).

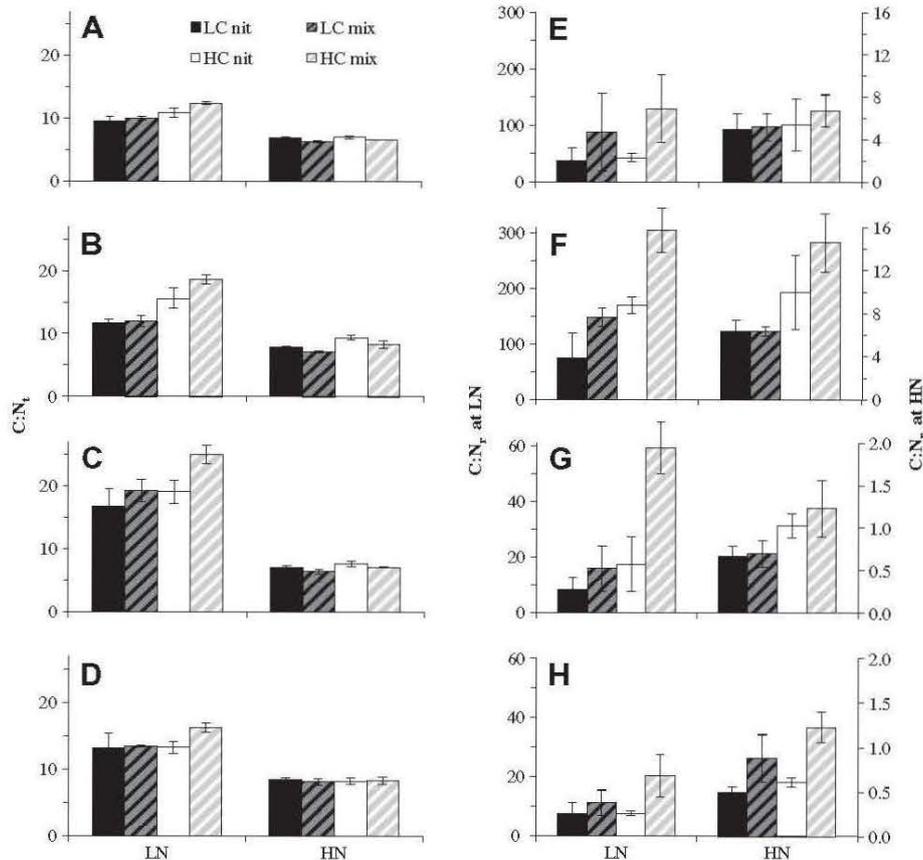


Fig. 3. C:N ratios in the total biomass of developing leaves (A), developed leaves (B), stem (C) and roots (D) at 35 das (days after sowing) and in the resource biomass of developing leaves (E), developed leaves (F), stem (G) and roots (H) at 35 das. Vertical bars denote SE. HN: high [N], LN: low [N], HC: high [CO₂], LC: low [CO₂], nit: N provided as pure NO₃, mix: N provided as a NO₃/NH₄ mixture.

Both ratios responded significantly to N form. In leaves, for instance, NH_4 increased significantly C:N_t under LN in developing leaves and C:N_r in developed leaves. N_{mix} lowered C:N_t significantly under HN in developed leaves only. In developing leaves, the CO_2 treatment was significant on C:N_t under LN only. In roots, there was no interaction between $[\text{CO}_2]$ and $[\text{N}]$. Among organs, the ratios were the most variable in stems.

2.2. Metabolite concentrations correlated with C:N ratios

2.2.1. Primary metabolites

Developing leaf and root [starch] was more responsive than [free carbohydrates] to C and N treatments. In stems, [starch] and [free carbohydrates] exhibited the same positive pattern in response to C:N ratio (Fig. 4).

In stems, [starch] was always lower than [free carbohydrates]. In other organs, this occurred only at the lowest C:N values.

Starch concentration correlated significantly to C:N_t in all organs (Fig. 4A–D, diamonds and dashed lines), the positive slope being highest in leaves (7.5 mg g^{-1} dry wt per C:N_t unit, in both developing and developed leaves) and one order of magnitude lower in other organs (0.7 and 0.1 in stems and roots, respectively). The concentration of free carbohydrates (Fig. 4A–D, crosses and solid lines) was also strongly correlated to C:N_t , except in fully developed leaves. The positive slopes were the highest in roots and developing leaves (2.8 mg g^{-1} dry wt per C:N_t unit in both organs) and the lowest in stems (1.2).

The same patterns occurred for the correlations of [starch] and [free carbohydrates] to C:N_r (Fig. 4E–H). As well, there was no significant correlation between [free carbohydrates] and C:N_t in

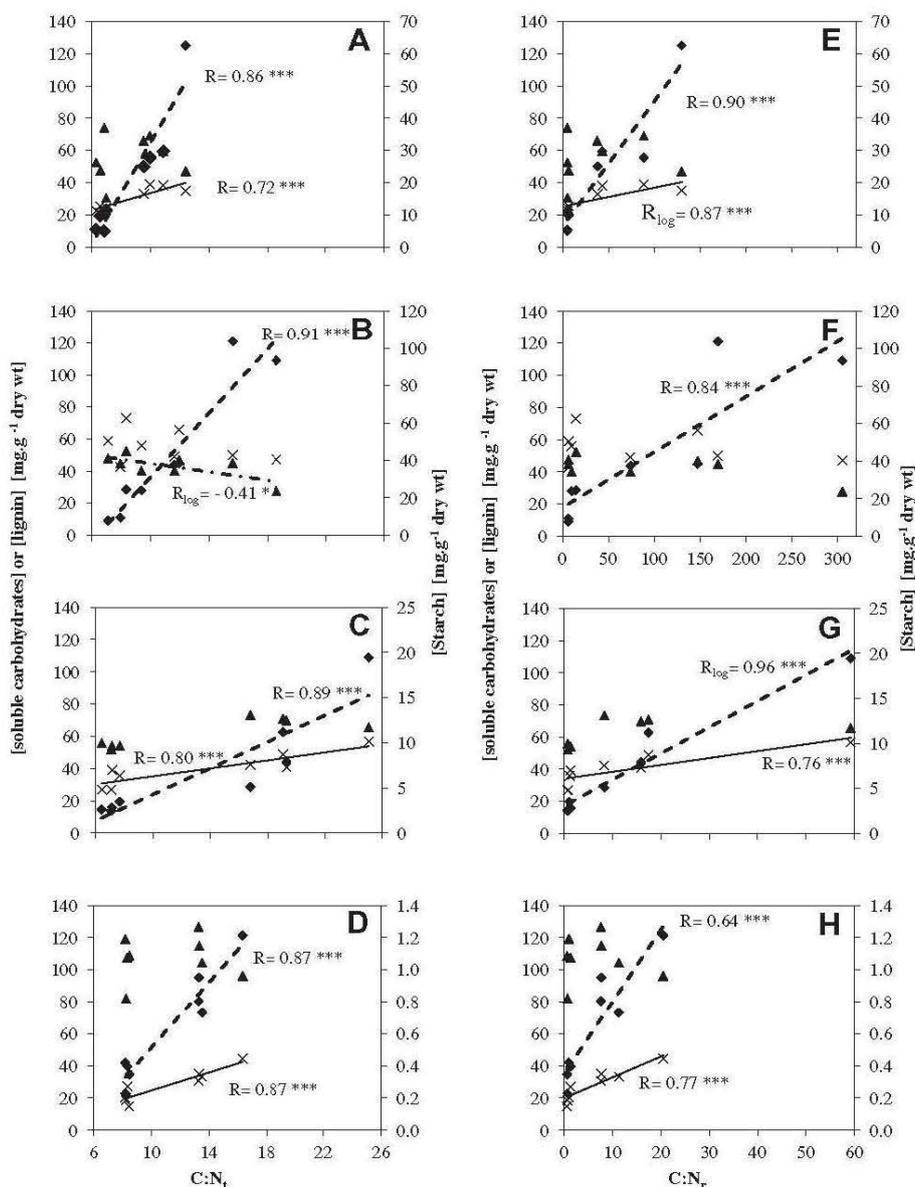


Fig. 4. Soluble carbohydrates, lignin and starch concentrations plotted against total C:N ratio in developing leaves (A), fully developed leaves (B), stem (C) and roots (D) at 35 das (days after sowing). Soluble carbohydrates, lignin and starch concentrations plotted against resource C:N ratio in developing leaves (E), fully developed leaves (F), stem (G) and roots (H) at 35 das. Regression line is represented for soluble carbohydrates (x) by a solid line, for starch (♦) by a dashed line, for lignin (▲) by a dash-dot line. For the sake of clarity, vertical and horizontal error bars are not plotted. Lines are drawn only when the regressions are significant ($P < 0.05$), $n = 3$. R : Pearson coefficient, R_{log} : Pearson coefficient with log-transformed values, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

developed leaves (Fig. 4F, crosses). Because the range of C:N_t values was much larger than that of C:N_r, the positive slopes of regressions were lower with C:N_t in all organs. For instance, in developed leaves, the slope of [starch] was only 0.3 mg g⁻¹ dry wt per C:N_t unit.

In stems, [starch] was higher in LN_{mix} than in LN_{nit} and there was no NH₄ effect at HN. In developed leaves and roots, [free carbohydrates] were higher in N_{mix} than in N_{nit}, whatever the [N].

2.2.2. Defence-related metabolites

In all organs, the concentrations of C-based secondary compounds (Fig. 5A–D) were significantly and positively correlated to C:N_t. The developing leaves stood out with concentrations 2–3-fold higher than in other organs and a higher slope for [CGA] concentration (0.25 mg g⁻¹ dry wt per C:N_t unit, compared to 0.1 in devel-

oped leaves and roots, and 0.02 in stems). The same pattern was observed for rutin and KR when present (rutin was not detected in roots and KR was found only in leaves).

The same significant relationships were observed with C:N_r (Fig. 5E–H) with comparable *R* values. Similarly to primary metabolites, the slopes were lower with C:N_r (0.002–0.04 mg g⁻¹ dry wt per C:N_r unit) than with C:N_t.

CGA was the sole compound that responded to N forms: with NH₄ in the nutrient solution, its concentration was higher under LN than HN and under HC than LC.

Tomatine concentration was, in most organs, higher than C-based defence chemicals. Its highest content was found in developing leaves (6–11 mg g⁻¹ dry wt) followed by roots (4.5–7). Fully developed leaves and stems contained about the same concentration (~1.5–3.5). In all organs, [tomatine] increased significantly

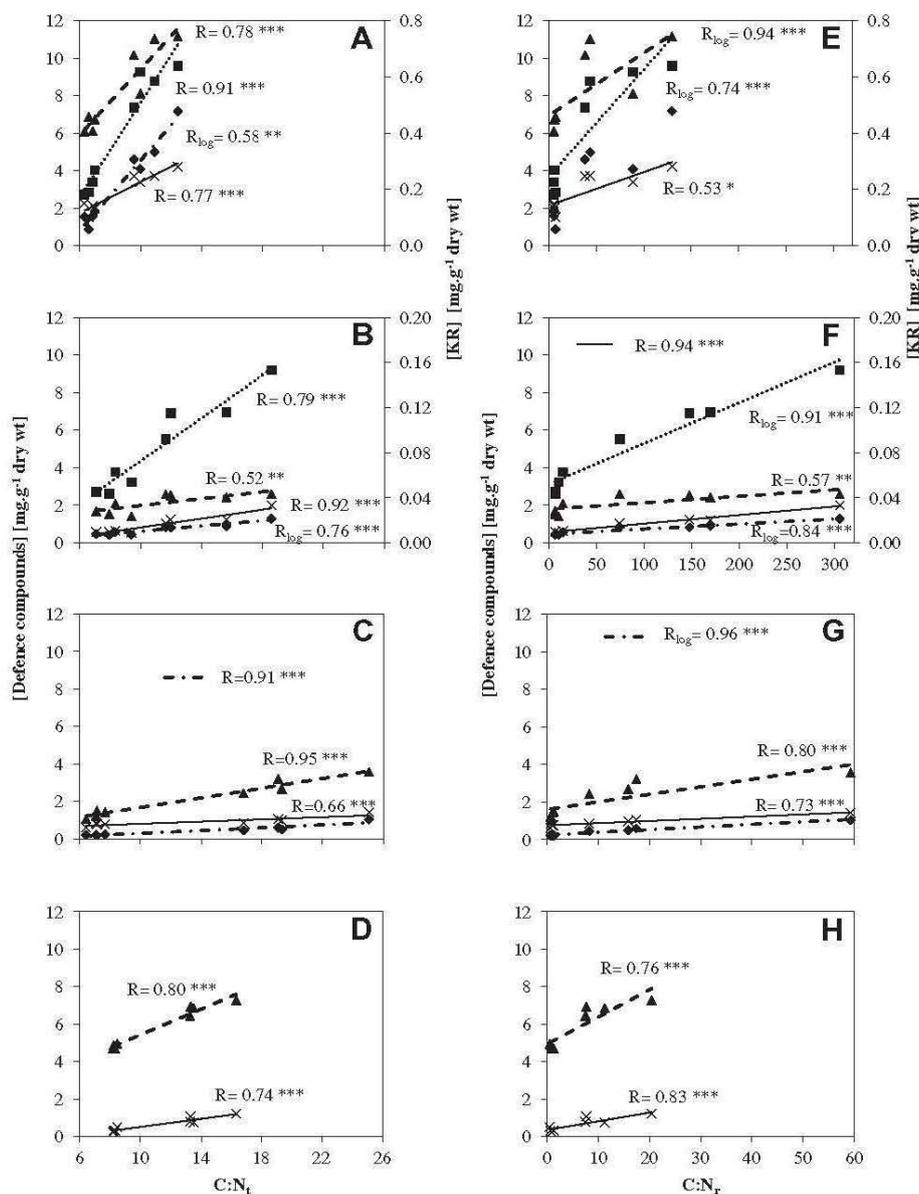


Fig. 5. Concentrations of defence-related compounds plotted either against total C:N ratio in developing leaves (A), fully developed leaves (B), stem (C) and roots (D) at 35 das (days after sowing) or against resource C:N ratio in developing leaves (E), fully developed leaves (F), stem (G) and roots (H) at 35 das. Regression line is represented for chlorogenic acid (x) by a solid line, for tomatine (▲) by a dashed line, for rutin (◆) by a dash-dot line and for kaempferol-rutinoside (KR) (■) by a dotted line. For the sake of clarity, vertical and horizontal error bars are not plotted. Lines are only drawn when the regressions are significant ($P < 0.05$), $n = 3$. *R*: Pearson coefficient, R_{\log} : Pearson coefficient with log-transformed values, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

with C:N_t (Fig. 5A–D, triangles and dashed lines) and C:N_r (Fig. 5E–H), the slope being the highest in developing leaves. There was no effect of NH₄ on the tomatine concentration, whatever the organ or the [N].

2.2.3. Lignin

Lignin was found in all organs at concentrations (1–15% dry wt) similar to those of primary metabolites and higher than those of defence chemicals (<1% dry wt). The roots contained the highest [lignin] (82–126 mg g⁻¹ dry wt) followed by stems (52–73), developing leaves (46–74) and developed leaves (<50).

Lignin concentration was not significantly related to C:N_t (Fig. 4A–D, triangles), except in developed leaves where a slight negative slope (*) was found. Furthermore, no significant correlation was found in any organ when relating [lignin] to C:N_r (Fig. 4E–H, triangles).

There was no effect of NH₄ on the lignin concentration, whatever the organ or the [N].

3. Discussion

Air CO₂, mineral N concentration and form were used successfully to alter the C to N ratio in tomato organs. This easily measurable ratio is known to relate well with the organ composition in primary metabolites that feed both growth and the secondary metabolism. Thus, at first sight, a correlation between the secondary metabolite content and C:N can also be expected. However, hypotheses on plant defence, such as the GDB evoked in the introduction section, lay on a trade-off between growth and defence, not directly between primary and secondary metabolisms. This is why, in this paper, we compared the responses of secondary metabolites known to contribute to defence as deterrent for pests (tomatine, CGA) (Fleuriet and Macheix, 1976; Friedman, 2002). We quantified lignin, a compound contributing to growth and development, as an end-product of the phenylpropanoid pathway. This compound contributes also to plant defence by opposing a physical barrier to pests (Vance et al., 1980).

3.1. Treatments affected growth and primary compound concentrations as says the literature

Atmospheric C and mineral N availabilities set a large range of C to N ratios in all organs. The ratios were higher under elevated CO₂ (Bazzaz, 1990; Schädler et al., 2007) and low mineral N supply (Hoffland et al., 1999). They were the most variable in stems with a delta of 16 between the lowest and highest C:N, confirming data on another *solanacea* (Matros et al., 2006 in tobacco).

In this experiment, growth responded as expected to air CO₂ and N availabilities: elevated CO₂ increased dry wt significantly through higher LA and enhanced photosynthesis, while N limitation was mild enough to reduce significantly dry wt by restricting LA without affecting significantly the net photosynthesis per unit leaf area. The same results were obtained on tomatoes grown in similar conditions (Adamowicz and Le Bot, 2008). According to the GDBH (Herms and Mattson, 1992), conditions that restrict growth but not photosynthesis, favor an enhanced production of defence chemicals without dramatic change in the accumulation of primary metabolites. This is what we observed in our study, regarding carbohydrate concentrations (starch and free sugars; Fig. 4).

Starch was the most reactive to C:N. Its concentration increased tenfold with both C:N in mature leaves, whereas the biomass was reduced only threefold. Our data confirm that growth was more affected by N deprivation than C assimilation as was the case in the work of Hoffland et al. (2000). In such circumstance, C surplus can

accumulate as reserve compounds in leaves. In N limited plants, most of the carbohydrates accumulate as starch and soluble sugars decrease (Geiger et al., 1999). Moreover, nitrate is considered as a signal that represses starch metabolism in tobacco (Scheible et al., 1997).

Developing leaves behaved differently from adult leaves. Indeed, the former can be considered as C sinks, and the latter as C sources resulting in a resource gradient between these organs. Accordingly, carbohydrate concentrations were lower in the developing leaves. Presumably they were used for growth and respiration in young tissues.

3.2. C- and N-based defence compounds were positively correlated to C:N ratios

Only tomatine and CGA were found in all organs. Roots contain neither rutin nor KR, and stems were lacking KR, as already observed in tomato (Larbat et al., 2012a,b).

All these compounds, derived from the phenylpropanoid pathway (CGA, rutin and KR), correlated positively to C:N. This has already been observed in leaves of tomato (Hoffland et al., 2000) and tobacco (Matros et al., 2006), but we showed here that it also applies to stems and roots.

The developing leaves had the highest concentrations of defence chemicals among all organs and were also the most responsive to C:N. This is consistent with the observation that low molecular weight secondary metabolites concentrate in buds and immature leaves and decline as leaves expand (McKey, 1974), which has been explained by a dilution effect of leaf expansion (Bodnaryk and Palaniswamy, 1990; Zobel and Brown, 1990). Our observations are in line with the optimal defence theory (Rhoades, 1979) predicting that plant parts with higher fitness will be highly defended. Young tomato leaves presented a high constitutive level of defence chemicals and also a high inducibility by resource availability. The allocation of secondary compounds to vulnerable tissues represents a small defensive investment for plant.

The glycoalkaloid tomatine was the main defence chemical in all organs. This N-containing metabolite responded to C:N following the same pattern than the C-based secondary compounds, which is consistent with the findings of Hoffland et al. (1999). This was unexpected from a trophic viewpoint where N limitation (i.e. high C:N) should restrict the synthesis of N-containing molecules (Bryant et al., 1983), as observed for nicotine in tobacco (Baldwin et al., 1994; Matros et al., 2006). The higher N proportion in nicotine (C:N = 5) than in tomatine (C:N = 49) may explain these contrasted observations. We assume that under N limitation, the N uptake from the nutrient solution and plant N stores were enough for tomatine synthesis.

3.3. The form of N supply influenced chlorogenic acid concentrations

According to the literature (Cox and Reisenauer, 1973; Zornoza et al., 1991), the addition of more than 40% of ammonium in total nitrogen fertilization can decrease the biomass production of plants and ammonium toxicity can appear. We added 30% of ammonium and obtained no significant difference of biomass production between plants growing with or without ammonium. It proves, therefore, that our tomato plants were not intoxicated by an excessive content of ammonium in the medium.

The C:N range was markedly extended when 30% of N in solution was provided as ammonium. Moreover, the addition of NH₄ increased selectively the concentration of CGA and starch at low N supply. Therefore, acting on the balance between ammonium and nitrate in the nutrient solution can be a tool to manipulate selectively some metabolites. Ammonium effects on primary metabolites have been described for long (Haynes and Goh,

1978), but, to our knowledge, this is the first report of specific effects on defence-related compounds.

3.4. Lignin did not correlate to C:N ratios

We quantified lignin, an end-product of the phenylpropanoid pathway that yields all phenolic soluble compounds discussed above. Lignin represented a strong C sink, as its concentration was higher than the defence-related secondary compounds that we quantified. Our findings indicate that lignin did not respond to treatments as the other phenolics. In contrast with phenolics and tomatine, lignin was not or little responsive to C:N ratio, at the phenological stages investigated (young plants, at flowering stage for the oldest). Lignin concentration was negatively affected by changes of C:N ratio in fully developed leaves.

In accordance with most theories, we expected more lignification to occur under low N, but this was not the case in this study. Thus, it is likely that N-deficiency rather than N-limitation is required to get a response. Therefore, under such a N limitation, tomatoes did not prioritize the quantitative allocation of C to the development of a physical barrier. This may suggest that in the plant defence scheme, lignification could be a consequence rather than a short-term strategy. A recent study by Løvdal et al. (2010) concluded also that in situation of N deficiency, lignification did not occur in tomato stems.

3.5. Restricting C:N to the resource pool did not improve correlations

The synthesis of secondary compounds requires C and N from the resource pool. Within this pool, we quantified ammonium and nitrate, the latter being reported to be the major constituent of the metabolic pool in tomatoes (Cárdenas-Navarro et al., 1999; Huanosto Magaña et al., 2009). Considering that the phenylpropanoid metabolism is stimulated by changes in nitrate content, rather than downstream N metabolites (Fritz et al., 2006), we expected phenylpropanoids to correlate better with C:N_r than C:N_t. The C:N_r range proved indeed wider than the C:N_t range, but the correlation coefficients were not stronger. This may be due to the obvious limitations of the analytical definition of C and N resources. For instance, Huanosto Magaña et al. (2009) included non-structural carboxylates (mainly malate and citrate) in the C pool, and free amino acids in the N pool. They found that both pools were variable with N nutrition, but the question remains if a hypothetical correlation improvement resulting from an exhaustive definition of resources would be worth the analytical load.

4. Conclusions

The tomatoes displayed a large plasticity in traits such as growth rate, leaf area and C:N in response to contrasted C and N availabilities. From these results, we can extract general trends on an array of defence-related compounds. Considering different organs (developing and fully developed leaves, stems, roots), our study gives a spatial resources allocation to plant defence.

From our study, the C:N ratio appears to be an integrative indicator of the plant nutrition status, whose variation can be correlated to that of some compounds forming the chemical barrier of plant defence. Since the C:N ratio was closely correlated with concentrations of key secondary plant-defence compounds, the use of the organ C:N balance to evaluate the plant's 'defence status' has a strong practical advantages because it is easy to determine.

Adding ammonium to the N supply increased the concentration of chlorogenic acid under N limitation. Lignin concentration was not influenced by C:N ratio. The N-containing glycoalkaloid tomatine showed the same response pattern to C:N than C-containing

defence compounds, and thus followed the same growth – defence trade-off theory.

By affecting plant growth and plant chemistry, a combination of environmental parameters (e.g. [CO₂] and [N]) could affect the performance of herbivores or disease agents.

5. Materials and methods

5.1. Plant material, growth conditions and experimental treatments

Tomato plants (*S. lycopersicum* L. cv Better Bush, Park Seed, SC-USA) were sown in a hydroponic system in a growth chamber with the following conditions: 75% humidity in the dark during three days, then 16 h photoperiod at 23/18 °C (day/night).

Twelve days after sowing (das), the plantlets were transferred to NFT systems (Nutrient Film Technique) located in two twin glasshouses with regulated temperatures (18–25 °C), one under ambient air (LC) and the other under CO₂-enriched (HC, 700 μl l⁻¹) air.

Air temperature and global radiation were measured at 10 s intervals. The records of temperature and global radiation indicated no difference between the two glasshouses (Supplementary data, S1. A and B). The CO₂ partial pressure was continuously monitored by an IRGA (ADC 225 MK3, Hoddesdon, UK) in both greenhouses and regulated at 700 μl l⁻¹ in the HC treatment with a mass flow meter coupled to a CO₂ gas cylinder (Supplementary data S2).

In each glasshouse, the plants were set in three blocks with two N regimes: limiting N (LN = 0.1 mM) and adequate N (HN = 7 mM) as previously defined in similar cultural conditions (Adamowicz and Le Bot, 2008). In each regime, N was provided either as pure NO₃ (N_{nit}) or as a NH₄/NO₃ mixture (N_{mix}, 30/70 mol/mol). The nutrient solutions were prepared with water and pure salts at the following concentrations for LN_{nit} and LN_{mix} solutions (mM): K 3; Ca 3.5; H₂PO₄ 1; Mg 1.5. In HN_{mix}, they were: K 2.5; Ca 3.25; H₂PO₄ 1.0; Mg 1.25. In all N_{nit} solutions, [NO₃⁻] + 2x[SO₄²⁻] was equal to 12. In N_{mix} solutions, [NO₃⁻] + 2x[SO₄²⁻] was equal to 12.075 in LC solution and to 12.6 in HN solution. Ammonium was brought either by NH₄NO₃ (HN) or by (NH₄)₂SO₄ (LN). In all solutions, the trace elements were provided as EDTA-Fe (43 μM) and 0.3 ml l⁻¹ of a stock solution with the following mM concentrations: Mo 0.94; Mn 38.8; Zn 10.8; Cu 1.6; B 68.7; Fe 35.8. The solution volumes were 8–10 l per plant at experiment start, then 16 l per plant between the first and the second sampling, and 40 l per plant between the second and the third sampling.

The solution [NO₃], and pH were measured and rectified manually with an increasing frequency as growth proceeded, up to once a day. Nitrate was measured manually by spectral deconvolution in the UV domain according to the method of Adamowicz et al. (2012). Corrections were done by additions of a 1 N NO₃ stock solution containing 0.408 KNO₃, 0.204 Ca(NO₃)₂ and 0.092 Mg(NO₃)₂ (Adamowicz et al., 2012). Adjustments of [NH₄] were made according the NO₃ consumption, at the same frequency that [NO₃]. [NH₄] was maintained by additions of a 0.5 M (NH₄)₂SO₄ stock solution. The pH was maintained in between 5 and 6 by H₂SO₄ additions.

5.2. Photosynthesis

Net CO₂ assimilation rate (A_{net}) was measured around noon, before the last harvest (47 das), using a portable photosynthesis system (CIRAS-1, PPSystems, Hitchin, UK) equipped with a halogen lamp in order to control PPF during measurements (set at 700 μmol photons m⁻² s⁻¹). Other conditions (temperature, [CO₂] and humidity) were set at the glasshouse ambience and varied between 19.5 and 21.5 °C during measurements. Two measurements

were made on each plant, one on a developing leaf and the other on a developed leaf. The measurements were triplicated in each treatment. For all plants, the same leaf rank was chosen by counting the number of leaves from the apex (leaf number three for the developing leaves and leaf number six for the developed leaves).

5.3. Harvests and sample preparation

To avoid any mechanical stress and elicitations of metabolic pathways, plants were never handled between harvests. These were carried out at 27, 35 and 47 das, corresponding to the vegetative, flower buds appearance and blooming stages, respectively.

At harvest, the total leaf area (LA) was measured (Li-3100 C Area Meter, Li-Cor, Lincoln Nebraska, USA) and four plant parts were separated (roots, stems, developed and developing leaves). The roots were rinsed with deionized water. Plant parts were frozen in dry ice and stored at -20°C until freeze-drying. The dry samples were weighed (dry wt), ground to a fine powder and stored at 27°C in a temperature-controlled oven until analyses.

5.4. Plant analyses

5.4.1. Elemental analysis

Total C and N contents were determined on ca. 3 mg dry powder weighed exactly, according to the Dumas method, with an elemental auto-analyser (Flash EA 1112 series, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France).

5.4.2. Nitrate and ammonium

NO_3 and NH_4 were extracted from 20 mg dry powder with 2 ml H_2O during 1 h at 45°C . After centrifugation (15 min, 10,000 g), the supernatants were filtered (0.45 μm nylon filter) prior to analysis on a DX-320 ion chromatograph (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

A Dionex IonPac AS11-HC (250 mm \times 4.0 mm) analytic column, an IonPac AG11 (50 mm \times 4.0 mm) guard column and an electrochemically regenerated ASRS suppressor were used for NO_3 . Injection volume was 25 μl . Isocratic 30 mM KOH eluent was electrolytically generated at 1 ml min^{-1} using an EG40 Eluent Generator equipped with EluGen-OH cartridge and a continuously regenerated anion trap column.

A Dionex IonPac CG12A/CS12A (guard column/column) and an electrochemically regenerated CSRS suppressor were used for NH_4 . Ammonium was eluted with 20 mM of methanesulfonic acid at 1 ml min^{-1} . All measurements were carried out at 25°C for both elements.

5.4.3. Non-structural carbohydrates

Soluble carbohydrates were extracted (10 mg dry wt/ml 80% ethanol) during 30 min at 80°C . After centrifugation (10 min, 12,100 g), the supernatant was collected and evaporated to dryness (Speedvac, Savant, USA). This operation was repeated twice, and the residue was dissolved in 0.5 ml of ultra pure water. Glucose, sucrose and fructose were measured enzymatically (Enzytec Sucrose/ β -Glucose/ β -Fructose Réf 1002864, R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

The pellet was vacuum dried for 10 min, dissolved in 1 ml NaOH 0.02 N, autoclaved and centrifuged for 2 min at 12,600 g. Starch was determined enzymatically (Enzytec Starch Réf 1002942, R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

5.4.4. Phenolics and glycoalkaloids

Extraction was adapted from Bénard et al. (2009) and all steps were carried out at 4°C . Fifty mg of dry powder was extracted in 1 ml of 60% aqueous methanol and 50 μl taxifolin (internal standard, 2 mg ml^{-1} methanol), then blended (1 min) and centrifuged (10 min, 2400 g). The extraction was repeated and the superna-

tants pooled and vacuum dried. The residue was dissolved (1 ml 70% methanol) and filtered (0.45 μm) before analysis.

Phenolics from 50 μl samples were separated by HPLC (model LC-20AD, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) on a RP-18 column (4 mm \times 250 mm, 5 μm , Merck, Darmstadt, Germany) fitted with a guard column (Lichrospher RP-18, 5 μm , Merck). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in ultra-pure water (A solvent) and 0.1% formic acid in methanol (B solvent). The gradient (10% B 2 min; 10–50% B in 50 min; 50–90% of B in 20 min; 90% B 5 min; 90–10% B in 10 s; 10% B 11 min) was eluted at 0.5 ml min^{-1} . Rutin, CGA, and KR were correctly separated. Detection was performed by a diode array detector (200–400 nm) and quantification from peak area was referred to rutin, CGA and KR standards (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) and taxifolin standards (Extrasynthese, Lyon, France).

Tomatine was separated and detected from 2 μl samples previously diluted 50-fold in 70% methanol with solanine as internal standard (50 μM , Extrasynthese) on a HPLC-MS (LTQ-MS, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) with the following settings: voltages (V) spray 4500, capillary 49, split lens -44 , front lens -3.25 ; capillary temperature 275°C ; gas flow rates (arbitrary units) 40 sheath, 10 auxiliary, 10 sweep. Separation was performed on a C18 column (150 mm \times 2.1 mm, 5 μm , Alltech Associates Inc., PA-USA). The mobile phase was the same as used for phenolics separation and the gradient (55–90% B in 10 min; 90–100% B in 10 s; 100% B 5 min; 100–55% B in 10 s; 55% B 5 min) was eluted at 0.2 ml min^{-1} . Tomatine was quantified from two cumulative scans in selective ion monitoring mode as this chemical produces two major ions at m/z 529 and 578.5 (Cataldi et al., 2005). Linear results were obtained in the 0.2–10 μM range on tomatine standards (Sigma).

5.4.5. Lignin

Lignin was extracted and determined according to the acetyl bromide method of Morrison and Stewart (1995) and referring to lignin standards (Sigma).

5.5. Data processing

The C-resources were computed as the sum of C atoms contained by non-structural carbohydrates (starch, glucose, fructose and sucrose) and the non-structural N as the sum of N atoms contained by nitrate and free ammonium ions in plant tissues. The amino-acid and carboxylate fractions were not considered as they were quantified previously to represent at less than 5% of the total dry weight in tomato (Huanosto Magaña et al., 2009). All ratio data were expressed on a per mole basis.

All data were subjected to mixed four-way analyses of variance ($[\text{CO}_2]$, [N] and N form as fixed factors, and blocks nested in CO_2 as random factor) using the procedure `lm` in R software (R project for Statistical computing, <http://www.R-project.org>). The statistical significance was set at $P < 0.05$. Because all interactions between blocks and fixed factors were always of the same orders of magnitude, they were pooled in a single residual. The respective degrees of freedom were: $[\text{CO}_2] = 1$, blocks in $\text{CO}_2 = 4$ as residuals for $[\text{CO}_2]$ treatment, other treatments and interactions 1 with residuals 12. Normal Q–Q plots and correlation between variance and means assessed the data distribution and homoscedasticity. When necessary, the data were log or power transformed. Correlation coefficients were computed according to Pearson (normal distributions). And when necessary, the data were log transformed.

Acknowledgements

Ph.D. grant of M.R. was funded by INRA Département Environnement et Agronomie and Regional Council of Lorraine. We thank

Claude Gallois for his technical help, Aude Fauvet (INRA) for her strong contribution to this work (sampling and sample preparation, CN and carbohydrate analyses), Patrick Gross (INRA) for the regulations in the glasshouses, Cédric Paris (Université de Lorraine) for the sample analyses in LC–MS and Stéphanie Ouvrard (INRA) for the ionic chromatography analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.12.003>.

References

- 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 Phytol.* 180, 663–672.
- Adamowicz, S., Le Bot, J., Huanosto Magaña, R., Fabre, J., 2012. Totomatix: a novel automatic set-up to control diurnal, diel and long-term plant nitrate nutrition. *Ann. Bot.* 109, 309–319.
- Baldwin, I.T., Karb, M.J., Ohnmeiss, T.E., 1994. Allocation of ¹⁵N from nitrate to nicotine: production and turnover of a damage-induced mobile defense. *Ecology* 75, 1703–1713.
- Bazot, S., Mikola, J., Nguyen, C., Robin, C., 2005. Defoliation-induced changes in carbon allocation and root soluble carbon concentration in field-grown *Lolium perenne* plants: do they affect carbon availability, microbes and animal trophic groups in soil? *Funct. Ecol.* 19, 886–896.
- Bazzaz, F.A., 1990. The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 167–196.
- Bénard, C., Gautier, H., Bourgaud, F., Grasselly, D., Navez, B., Caris-Veyrat, C., Weiss, M., Génard, 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. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4112–4123.
- Bodnaryk, R.P., Palaniswamy, P., 1990. Glucosinolate levels in cotyledons of mustard, *Brassica juncea* L. and rape, *B. napus* L. do not determine feeding rates of flea beetle, *Phyllotreta cruciferae* (Goeze). *J. Chem. Ecol.* 16, 2735–2746.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S., Klein, D.R., 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* 40, 357–368.
- Cárdenas-Navarro, R., Adamowicz, S., Robin, P., 1999. Nitrate accumulation in plants: a role for water. *J. Exp. Bot.* 50, 613–624.
- Cataldi, T.R.L., Lelario, F., Bufo, S.A., 2005. Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3103–3110.
- Cox, W.J., Reisenauer, H.M., 1973. Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. *Plant Soil* 38, 363–380.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Nutrition, Rockville, pp. 1250–1318.
- Fleuriot, A., Macheix, J.J., 1976. Effect of anaerobic conditions on the phenolic compounds of 'Cherry' tomatoes, *Lycopersicon esculentum* var. Cerasiforme. *Physiol. Veg.* 4, 407–414.
- Friedman, M., 2002. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* 50, 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. *Plant J.* 46, 533–548.
- Geiger, M., Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U., Stitt, M., 1999. The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ.* 22, 1177–1199.
- Graham, C.J., 2002. Nonstructural carbohydrate and prunasin composition of peach seedlings fertilized with different nitrogen sources and aluminum. *Sci. Hortic.* 94, 21–32.
- Grechi, I., Vivin, P., Hilbert, G., Milin, S., Robert, T., Gaudillère, J.P., 2007. Effect of light and nitrogen supply on internal C:N balance and control of root-to-shoot biomass allocation in grapevine. *Environ. Exp. Bot.* 59, 139–149.
- Haynes, R.J., Goh, K.M., 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 53, 465–510.
- Hermes, D.A., 2002. Effects of fertilization on insect resistance of woody ornamental plants: reassessing an entrenched paradigm. *Environ. Entomol.* 31, 923–933.
- Hermes, D.A., Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.* 67, 283.
- 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. *J. Chem. Ecol.* 26, 2697–2711.
- Hoffland, E., Van Beusichem, M.L., Jeger, M.J., 1999. Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant Soil* 210, 263–272.
- Horchani, F., Hajri, R., Aschi-Smiti, S., 2010. Effect of ammonium or nitrate nutrition on photosynthesis, growth, and nitrogen assimilation in tomato plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, 610–617.
- Huanosto Magaña, R., Adamowicz, S., Pagès, L., 2009. Diel changes in nitrogen and carbon resource status and use for growth in young plants of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Ann. Bot.* 103, 1025–1037.
- Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z.E., Rahmat, A., Rahman, Z.A., 2011. The relationship between phenolics and flavonoids production with total non structural carbohydrate and photosynthetic rate in *Labisia pumila* Benth. under high CO₂ and nitrogen fertilization. *Molecules* 16, 162–174.
- Jones, C.G., Hartley, S.E., 1999. A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos* 86, 27–44.
- Lam, S.K., Chen, D., Norton, R., Armstrong, R., Mosier, A.R., 2012. Nitrogen dynamics in grain crop and legume pasture systems under elevated atmospheric carbon dioxide concentration: a meta-analysis. *Global Change Biol.* 18, 2853–2859.
- Larbat, R., Le Bot, J., Bourgaud, F., Robin, C., Adamowicz, S., 2012a. Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation. *Plant Biol.* (ISSN 1435–8603).
- Larbat, R., Olsen, K.M., Slimestad, R., Løvdaal, T., Bénard, C., Verheul, M., Bourgaud, F., Robin, C., Lillo, C., 2012b. Influence of repeated short-term nitrogen limitations on leaf phenolics metabolism in tomato. *Phytochemistry* 77, 119–128.
- Loomis, W., 1932. Growth-differentiation balance vs. carbohydrate-nitrogen ratio. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 29, 240–245.
- Løvdaal, T., Olsen, K.M., Slimestad, R., Verheul, M., Lillo, C., 2010. Synergic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry* 71, 605–613.
- Matros, A., Amme, S., Kettig, B., Buck-Sorlin, G.H., Sonnewald, U., Mock, H.P., 2006. Growth at elevated CO₂ concentrations leads to modified profiles of secondary metabolites in tobacco cv. SamsunNN and to increased resistance against infection with *potato virus Y*. *Plant Cell Environ.* 29, 126–137.
- McKey, D., 1974. Adaptive patterns in alkaloid physiology. *Am. Nat.* 108, 305–320.
- McKey, D., 1979. Distribution of secondary compounds within plants. In: Rosenthal, G.A., Janzen, D.H. (Eds.), *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press, New York, pp. 55–134.
- Minden, V., Kleyer, M., 2011. Testing the effect-response framework: key response and effect traits determining above-ground biomass of salt marshes. *J. Veg. Sci.* 22, 387–401.
- Mittelstrass, K., Treutter, D., Plessl, M., Heller, W., Elstner, E.F., Heiser, I., 2006. Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant Biol.* 8, 653–661.
- Morrison, I.M., Stewart, D., 1995. Determination of lignin in the presence of ester-bound substituted cinnamic acids by a modified acetyl bromide procedure. *J. Sci. Food Agric.* 69, 151–157.
- Peng, Y., Niklas, K.J., Sun, S., 2011. The relationship between relative growth rate and whole-plant C:N:P stoichiometry in plant seedlings grown under nutrient-enriched conditions. *J. Plant Ecol.* 4, 147–156.
- Rhoades, D.F., 1979. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: Rosenthal, G.A., Janzen, D.H. (Eds.), *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press, New York, pp. 4–54.
- Ruelas, C., Tiznado-Hernández, M.E., Sánchez-Estrada, A., Robles-Burgueño, M.R., Troncoso-Rojas, R., 2006. Changes in phenolic acid content during *alternaria alternata* infection in tomato fruit. *J. Phytopathol.* 154, 236–244.
- Sardans, J., Penuelas, J., 2012. The C:N:P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: a review and perspectives. *Perspect. Plant Ecol.* 14, 33–47.
- Schädler, M., Roeder, M., Brandl, R., Matthies, D., 2007. Interacting effects of elevated CO₂, nutrient availability and plant species on a generalist invertebrate herbivore. *Global Change Biol.* 13, 1005–1015.
- 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, 783–798.
- Stamp, N., 2004. Can the growth-differentiation balance hypothesis be tested rigorously? *Forum* 107, 439–448.
- Stitt, M., Krapp, A., 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 22, 583–621.
- Tuomi, J., 1992. Toward integration of plant defense theories. *Trends Ecol. Evol.* 7, 365–367.
- Van Etten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.E., 1994. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell* 6, 1191–1192.
- Vance, C.P., Kirk, T.K., Sherwood, R.T., 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 259–288.
- Zangerl, A.R., Berenbaum, M.R., 1993. Plant chemistry, insect adaptations to plant chemistry, and host plant utilization patterns. *Ecology* 74, 47–54.
- Zobel, A.M., Brown, S.A., 1990. Seasonal changes of furanocoumarin concentrations in leaves of *Heracleum lanatum*. *J. Chem. Ecol.* 16, 1623–1634.
- Zornoza, P., Sanz, J., Carpena, O., 1991. Analysis of the interaction between light and the type of nitrogen nutrition in tomato plants. *Suelo y Planta*. 1, 389–398.

Annexe 3 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en saccharose, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine dans la feuille inoculée des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Saccharose		Rutine	
LN	Te C	11.4 (±2.60)	8.2 (±1.55)	0.56 (±0.066)	0.40 (±0.130)
	C	10.5 (±1.20)	10.2 (±3.09)	0.64 (±0.363)	0.32 (±0.042)
HN	Te C	11.2 (±1.25)	9.6 (±4.47)	0.3 (±0.076)	0.22 (±0.107)
	C	10.3 (±2.08)	8.0 (±1.79)	0.28 (±0.039)	0.19 (±0.018)
		kaempferol-rutinoside		Tomatine	
LN	Te C	0.12 (±0.014)	0.021 (±0.002)	12.5 (±1.39)	14.1 (±0.16)
	C	0.14 (±0.052)	0.029 (±0.010)	13.5 (±2.82)	14.3 (±1.25)
HN	Te C	0.05 (±0.006)	0.014 (±0.0109)	9.1 (±1.69)	12.6 (±1.80)
	C	0.05 (±0.006)	0.018 (±0.0036)	9.9 (±1.52)	13.4 (±1.07)

Annexe 4 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en amidon, acide chlorogénique et caffeoyl-putrescine dans la tige inoculée des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Amidon		Acide chlorogénique	
LN	Te C	1.8 (±0.51)	0.56 (±0.181)	1.9 (±0.53)	0.43 (±0.062)
	C	2.5 (±0.69)	0.52 (±0.131)	2.2 (±0.55)	0.39 (±0.042)
HN	Te C	1.4 (±0.24)	0.35 (±0.042)	1.0 (±0.13)	0.38 (±0.104)
	C	1.6 (±0.40)	0.30 (±0.043)	1.2 (±0.25)	0.39 (±0.110)
		Caffeoyl putrescine			
LN	Te C	0.29 (±0.127)	0.12 (±0.060)		
	C	0.37 (±0.109)	0.16 (±0.044)		
HN	Te C	0.36 (±0.068)	0.17 (±0.074)		
	C	0.42 (±0.071)	0.19 (±0.050)		

Annexe 5 : Niveaux d'expressions en quantité relative (QR) des gènes *PAL5*, *HQT*, *F3H*, *SIPHT1* et 2 dans la feuille inoculée des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à $RQ_{min} \leq RQ_{moyen} \leq RQ_{max}$ à 95%

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		<i>PAL5</i>		<i>F3H</i>	
LN	Te S	1.05 ≤ 1.05 ≤ 1.05	0.51 ≤ 2.54 ≤ 12.53	0.26 ≤ 0.26 ≤ 0.26	0.012 ≤ 0.041 ≤ 0.138
	S	0.21 ≤ 0.62 ≤ 1.79	0.95 ≤ 2.13 ≤ 4.74	0.04 ≤ 0.05 ≤ 0.09	0.011 ≤ 0.048 ≤ 0.216
HN	Te S	1.87 ≤ 6.29 ≤ 21.20	2.83 ≤ 5.39 ≤ 10.23	0.04 ≤ 0.09 ≤ 0.25	0.003 ≤ 0.012 ≤ 0.046
	S	0.24 ≤ 0.36 ≤ 0.55	1.13 ≤ 2.76 ≤ 6.76	0.02 ≤ 0.02 ≤ 0.03	0.014 ≤ 0.036 ≤ 0.097
		<i>HQT</i>			
LN	Te S	1.00 ≤ 1.00 ≤ 1.00	0.48 ≤ 0.59 ≤ 0.72		
	S	0.57 ≤ 0.65 ≤ 0.72	0.67 ≤ 0.70 ≤ 0.73		
HN	Te S	0.67 ≤ 0.81 ≤ 0.98	0.58 ≤ 0.69 ≤ 0.81		
	S	0.46 ≤ 0.55 ≤ 0.66	0.56 ≤ 0.62 ≤ 0.69		
		<i>SIPHT1</i>		<i>SIPHT2</i>	
LN	Te S	0.8 ≤ 1.0 ≤ 1.3	4.1 ≤ 6.5 ≤ 10.3	0.60 ≤ 1.00 ≤ 1.68	0.09 ≤ 0.22 ≤ 0.53
	S	364.1 ≤ 434.3 ≤ 518.1	7.6 ≤ 8.5 ≤ 9.6	3202.5 ≤ 4066.5 ≤ 5163.5	59.7 ≤ 66.9 ≤ 75.1
HN	Te S	2.4 ≤ 2.9 ≤ 3.6	3.6 ≤ 5.5 ≤ 8.4	0.18 ≤ 0.58 ≤ 1.82	0.18 ≤ 0.36 ≤ 0.71
	S	753.0 ≤ 888.4 ≤ 1048.2	36.8 ≤ 42.2 ≤ 48.4	3401.1 ≤ 4774.8 ≤ 6703.5	335.0 ≤ 376.9 ≤ 424.0

Annexe 6 : Niveaux d'expressions en quantité relative (QR) des gènes *PAL5*, *HQT*, *F3H*, *SIPHT1* et *2* dans la zone inoculée des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à RQ min ≤ RQ moyenne ≤ RQ max

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		<i>PAL5</i>		<i>F3H</i>	
LN	Te C	0.47 ≤ 1.00 ≤ 2.12	6.05 ≤ 9.69 ≤ 15.53	0.30 ≤ 1.00 ≤ 3.28	0.06 ≤ 0.25 ≤ 0.99
	C	1.46 ≤ 1.46 ≤ 1.46	2.08 ≤ 3.73 ≤ 6.70	0.26 ≤ 0.26 ≤ 0.26	0.01 ≤ 0.03 ≤ 0.11
HN	Te C	0.14 ≤ 0.40 ≤ 1.10	2.36 ≤ 3.52 ≤ 5.24	0.16 ≤ 0.20 ≤ 0.25	0.07 ≤ 0.13 ≤ 0.23
	C	0.44 ≤ 0.69 ≤ 1.08	3.10 ≤ 5.35 ≤ 9.26	0.22 ≤ 0.26 ≤ 0.30	0.02 ≤ 0.07 ≤ 0.35
		<i>HQT</i>			
LN	Te C	0.10 ≤ 0.11 ≤ 0.13	0.11 ≤ 0.12 ≤ 0.13		
	C	0.08 ≤ 0.10 ≤ 0.13	0.05 ≤ 0.06 ≤ 0.08		
HN	Te C	0.12 ≤ 0.14 ≤ 0.16	0.06 ≤ 0.07 ≤ 0.07		
	C	0.22 ≤ 0.23 ≤ 0.25	0.09 ≤ 0.10 ≤ 0.12		
		<i>SIPHT1</i>		<i>SIPHT2</i>	
LN	Te C	393.2 ≤ 473.9 ≤ 571.0	367.5 ≤ 437.6 ≤ 521.2	0.02 ≤ 0.02 ≤ 0.02	0.01 ≤ 0.03 ≤ 0.09
	C	523.9 ≤ 617.1 ≤ 726.9	400.7 ≤ 532.6 ≤ 707.9	0.03 ≤ 0.04 ≤ 0.06	0.002 ≤ 0.02 ≤ 0.19
HN	Te C	406.7 ≤ 468.8 ≤ 540.4	643.1 ≤ 683.9 ≤ 727.2	0.62 ≤ 0.62 ≤ 0.62	0.11 ≤ 0.13 ≤ 0.16
	C	277.7 ≤ 316.0 ≤ 359.6	310.2 ≤ 354.2 ≤ 404.4	0.64 ≤ 0.84 ≤ 1.10	0.04 ≤ 0.04 ≤ 0.04

Annexe 7 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en glucose, fructose, kaempferol-rutinoside et tomatine dans la feuille « systémique » des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Glucose		Fructose	
LN	Te C	10.3 (±1.19)	7.5 (±2.27)	12.9 (±2.06)	8.5 (±1.85)
	C	9.0 (±1.59)	5.0 (±2.21)	13.4 (±3.66)	5.8 (±2.84)
HN	Te C	7.4 (±1.12)	7.5 (±1.89)	9.3 (±1.16)	9.0 (±2.15)
	C	7.8 (±2.32)	6.5 (±1.63)	8.8 (±1.33)	7.6 (±2.68)
		Kaempferol-rutinoside		Tomatine	
LN	Te C	0.14 (±0.012)	0.02 (±0.005)	22.1 (±7.99)	20.3 (±5.25)
	C	0.14 (±0.040)	0.02 (±0.003)	21.1 (±6.95)	14.5 (±4.07)
HN	Te C	0.06 (±0.013)	0.01 (±0.003)	13.4 (±2.59)	16.2 (±5.12)
	C	0.05 (±0.002)	0.01 (±0.002)	14.9 (±2.49)	13.9 (±2.94)

Annexe 8 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en saccharose, acide chlorogénique et tomatine dans les tiges des plantes témoins (Te S) ou inoculées avec *P. syringae* (S) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Saccharose		Acide chlorogénique	
LN	Te C	8.6 (±2.39)	15.6 (±5.09)	1.42 (±0.666)	0.29 (±0.083)
	C	7.4 (±2.21)	16.5 (±2.37)	1.12 (±0.332)	0.26 (±0.048)
HN	Te C	5.2 (±5.45)	25.7 (±4.41)	0.58 (±0.365)	0.33 (±0.155)
	C	8.9 (±1.61)	24.1 (±5.14)	0.56 (±0.055)	0.37 (±0.122)
		Tomatine			
LN	Te C	4.6 (±1.12)	4.0 (±0.72)		
	C	5.2 (±1.13)	3.8 (±0.39)		
HN	Te C	3.4 (±0.79)	3.9 (±0.58)		
	C	4.0 (±1.43)	3.8 (±0.63)		

Annexe 9 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en saccharose, amidon, rutine, tomatine et kaempferol-rutinoside dans la feuille « systémique » des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Saccharose		Amidon	
LN	Te C	5.8 (1.75)	4.7 (2.26)	17.1 (6.21)	5.0 (2.03)
	C	6.9 (0.72)	5.2 (2.75)	19.9 (3.48)	5.7 (3.67)
HN	Te C	5.9 (1.53)	5.0 (2.52)	6.2 (2.90)	5.2 (4.44)
	C	5.4 (0.72)	5.4 (3.39)	6.9 (1.35)	1.4 (1.03)
		Rutine		Tomatine	
LN	Te C	1.1 (0.16)	0.48 (0.059)	24.6 (8.40)	22.6 (3.34)
	C	1.0 (0.16)	0.45 (0.041)	24.9 (8.60)	23.0 (3.84)
HN	Te C	0.4 (0.04)	0.24 (0.052)	10.0 (4.66)	17.7 (3.82)
	C	0.5 (0.04)	0.22 (0.040)	15.7 (2.60)	15.6 (4.85)
		Kaempferol-rutinoside			
LN	Te C	0.17 (0.039)	0.021 (0.0029)		
	C	0.18 (0.043)	0.018 (0.0029)		
HN	Te C	0.08 (0.025)	0.009 (0.0029)		
	C	0.05 (0.024)	0.009 (0.0013)		

Annexe 10 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en saccharose, amidon, rutine et tomatine dans les tiges des plantes témoins (Te C) ou inoculées avec *P. corrugata* (C) poussant sous LN ou HN mesurées 24h et 12 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type) - n=6

		24h après inoculation	12 jours après inoculation	24h après inoculation	12 jours après inoculation
		Saccharose		Amidon	
LN	Te C	3.4 (±4.40)	6.1 (±2.36)	0.6 (±0.37)	1.4 (±0.21)
	C	10.2 (±3.48)	6.7 (±1.33)	0.9 (±0.57)	1.5 (±0.33)
HN	Te C	8.4 (±7.07)	13.0 (±3.79)	0.5 (±0.12)	0.9 (±0.27)
	C	9.5 (±4.73)	16.0 (±2.90)	0.7 (±0.32)	0.7 (±0.19)
		Rutine		Tomatine	
LN	Te C	0.037 (±0.0195)	0.20 (±0.042)	3.7 (±0.78)	5.1 (±0.86)
	C	0.040 (±0.0238)	0.19 (±0.026)	4.4 (±1.10)	5.7 (±1.69)
HN	Te C	0.040 (±0.0062)	0.11 (±0.035)	2.1 (±0.52)	4.4 (±1.40)
	C	0.039 (±0.0109)	0.12 (±0.012)	2.5 (±0.43)	3.8 (±0.97)

Annexe 11 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en glucose, fructose, saccharose et amidon dans les feuilles témoins, présentant des petites galeries, des grandes galeries, avec une larve ou une puppe de *Tuta absoluta* des plantes poussant sous une faible disponibilité en azote (LN) ou une forte disponibilité en azote (HN) mesurées 16 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type)

		LN	HN	LN	HN
		Glucose		Fructose	
Developpement de Tuta	Témoin	2.0 (±1.22)	1.5 (±0.95)	2.7 (±1.57)	1.6 (±1.16)
	petite galerie	6.9 (±5.21)	4.3 (±2.51)	9.7 (±7.62)	9.0 (±6.43)
	grande galerie	3.5 (±3.06)	1.5 (±0.29)	4.6 (±4.46)	1.5 (±0.65)
	larve	4.3 (±4.48)	1.4 (±0.94)	4.8 (±2.84)	2.7 (±2.97)
	puppe	4.2 (±2.00)	4.7 (±2.94)	6.2 (±3.40)	10.2 (±7.50)
		Saccharose		Amidon	
Developpement de Tuta	Témoin	0.5 (±0.49)	0.3 (±0.18)	0.5 (±0.62)	0.2 (±0.11)
	petite galerie	0.6 (±0.63)	1.9 (±2.46)	3.5 (±3.16)	2.8 (±2.02)
	grande galerie	0.2 (±0.15)	0.1 (±0.04)	1.1 (±1.63)	0.2 (±0.12)
	larve	2.6 (±1.48)	1.0 (±0.59)	3.6 (±5.13)	0.4 (±0.00)
	puppe	0.7 (±0.52)	1.3 (±0.95)	3.8 (±5.29)	3.9 (±3.80)

Annexe 12 : Concentrations (mg.g⁻¹ MS) en acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine dans les feuilles témoins, présentant des petites galeries, des grandes galeries, avec une larve ou une pupe de *Tuta absoluta* des plantes poussant sous une faible disponibilité en azote (LN) ou une forte disponibilité en azote (HN) mesurées 16 jours après inoculation - Les valeurs correspondent à : moyenne (± écart-type)

		LN	HN	LN	HN
		Acide chlorogénique		Rutine	
Developpement de Tuta	Témoin	0.14 (±0.022)	0.07 (±0.029)	0.77 (±0.084)	0.33 (±0.030)
	petite galerie	0.14 (±0.057)	0.11 (±0.046)	0.66 (±0.183)	0.31 (±0.054)
	grande galerie	0.12 (±0.053)	0.07 (±0.016)	0.70 (±0.113)	0.32 (±0.060)
	larve	0.19 (±0.105)	0.08 (±0.006)	0.78 (±0.160)	0.37 (±0.072)
	pupe	0.20 (±0.130)	0.08 (±0.035)	0.83 (±0.214)	0.32 (±0.058)
		Kaempferol-rutinoside		Tomatine	
Developpement de Tuta	Témoin	0.050 (±0.0122)	0.018 (±0.0066)	17.8 (±1.81)	12.4 (±2.22)
	petite galerie	0.038 (±0.0078)	0.016 (±0.0053)	16.3 (±0.53)	10.6 (±1.79)
	grande galerie	0.052 (±0.0147)	0.027 (±0.0056)	16.5 (±2.33)	12.0 (±2.00)
	larve	0.038 (±0.0169)	0.017 (±0.0108)	16.6 (±4.24)	12.8 (±2.05)
	pupe	0.048 (±0.0186)	0.017 (±0.0064)	17.4 (±2.62)	11.2 (±2.38)

A Nancy, le 06 mai 2013

No étudiant : 30600634

ROYER MATHILDE
13 D rue Docteur Albert
Schweitzer
42000 ST ETIENNE

Madame,

Par décision en date du 06 mai 2013, vous avez été autorisée à présenter en soutenance vos travaux en vue de l'obtention du diplôme :

Doctorat Sciences Agronomiques

La soutenance aura lieu le 22 mai 2013 à 14h00 à l'adresse suivante :

Salle Gallé - Ex Présidence de l'INPL - 2, Avenue de la Forêt de Haye 54500 VANDOEUVRE cedex

La soutenance sera publique.

Je vous prie d'agréer, Madame, l'expression de mes salutations distinguées.

Le Président

Pierre MUTZENHARDT

Etude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs

Dans un contexte de limitation de l'utilisation des pesticides, une voie de recherche prometteuse porte sur le déterminisme environnemental actionnant les mécanismes de défense de la plante, entre autres, la production de métabolites secondaires.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le compromis entre croissance et défense (métabolisme primaire vs. secondaire) dans les tissus de la plante saine ou attaquée par différents bioagresseurs, sous différentes conditions de disponibilité en ressources.

Pour cela, nous avons mesuré différents paramètres de croissance, les ratios C/N des tissus, les concentrations en principaux métabolites primaires (glucides simples, amidon) et en composés de défense (acide chlorogénique, rutine, kaempferol-rutinoside et tomatine) dans différents organes de tomate en culture hydroponique en serre ou phytotron.

Nous avons observé que les variations des ratios C/N total et de ressources sont positivement corrélées à celles de nombreux composés de défense quelle que soit leur composition en N et C. De plus, nous avons montré qu'en présence d'un bioagresseur, les concentrations des composés primaires et secondaires ne suivent pas la même évolution selon leur nature. La synthèse de caffeoyl putrescine est fortement induite lors de l'attaque par *P. syringae* alors que la concentration en acide chlorogénique est diminuée. L'inoculation de *P. syringae* réduit les concentrations en glucose et fructose alors que *P. corrugata* stimule leur synthèse. Enfin, nous avons observé qu'une faible disponibilité en azote altère le développement de *P. syringae*, *P. corrugata* et *Tuta absoluta* mais favorise le développement de *Botrytis cinerea*.

Nos résultats ont montré que le ratio C/N est un indicateur fiable du compromis croissance/défense dans le cas d'une plante saine. Dans le cas d'une plante attaquée, la répartition des ressources entre les différents métabolites varie en fonction du bioagresseur. Et chaque bioagresseur réagit de façon différente aux variations de disponibilité en azote de la plante. La maîtrise des conditions de culture apparaît comme un levier agronomique pertinent pour raisonner la lutte contre les bioagresseurs même s'il est difficile d'appliquer des règles générales sur l'interaction plante/environnement/bioagresseurs.

Mots clés : *Solanum Lycopersicum*, ratio C/N, polyphénols, glycoalcoïdes, glucides, bioagresseurs

Relations between growth, concentrations of primary and secondary metabolites and resources availability on tomato plant with or without pests

Nowadays, limiting the use of pesticides is mandatory. A promising way for research deals with the environmental determinism of plant defence mechanisms, among others, production of secondary metabolites. The aim of my PhD work was to study the trade-off between growth and defence (primary vs. secondary metabolism) in healthy plant tissues or attacked by different pests, under different conditions of resources availabilities.

We measured different growth parameters, C:N ratios of tissue, concentrations of main primary metabolites (simple carbohydrates, starch) and defence metabolites (chlorogenic acid, rutin, kaempferol-rutinoside and tomatine) on healthy or attacked tomato plant grown in hydroponic culture in greenhouse or phytotron.

We observed that variations of total and resources C:N ratios were positively correlated to that of several defence compounds whatever their composition in carbon and nitrogen. Moreover, we showed that, during pests attack, concentrations of primary and secondary metabolites did not follow the same evolution, depending on their nature. Caffeoyl putrescine synthesis was strongly induced by *P. syringae* inoculation whereas chlorogenic acid concentration decreased. Inoculation of *P. syringae* induced a strong decrease of concentration of glucose and fructose whereas inoculation of *P. corrugata* enhanced their synthesis. We observed that a low N availability alters the development of *P. syringae*, *P. corrugata* and *Tuta absoluta* but promotes the development of *B. cinerea*.

Our results showed that C:N ratio is a reliable indicator of the trade-off between growth and defence in the case of healthy plant. In attacked plant, the resources allocation between different metabolites varies with pests. And each pests reacts specifically to changes of N availability for the plant. Control of culture conditions appears to be a relevant agronomic tool to monitor the control of pests even if it is difficult to apply general rules to the interaction plant/environment/pests.

Keywords : *Solanum Lycopersicum*, C:N ratio, polyphenols, glycoalcoïdes, carbohydrates, pests