

Protocole de marquage à l'azote ^{15}N de fruits de tomate issus de plantes cultivées en condition standard

Correspondance

marie-helene.andrieu@inrae.fr

Marie-Hélène Andrieu¹
Isabelle Atienza¹
Cédric Cassan¹
Anne Marmagne²
Daniel Just¹
Willy Bienvenu³
Yves Gibon¹
Sophie Colombié¹

Résumé.

Estimer la stabilité des protéines dans un tissu végétal est une question essentielle mais complexe. Aujourd'hui, il n'existe que très peu de travaux montrant la faisabilité de mesurer le turnover d'un large panel de protéines végétales. Aussi, nous avons tenté d'incorporer l'azote ^{15}N dans le péricarpe de fruit de tomate en ajoutant 5 % de $\text{Ca } (^{15}\text{NO}_3)_2$ à la solution nutritive classiquement utilisée. Au bout d'un mois de culture avec notation d'anthèses, quatre cinétiques d'incorporation ont été réalisées sur des fruits à différents stades de développement. Démarrées simultanément, elles ont duré 11 jours. Le dosage des rapports isotopiques réalisés par EA-IRMS (Elementary Analysis - Isotopic Ratio by Mass Spectrometry) sur résidus insolubles après extraction hydro-alcoolique rend compte d'une bonne incorporation du marquage. Associés au dosage des protéines totales (Bradford), les résultats obtenus révèlent la très bonne linéarité de l'incorporation de l'azote ^{15}N dans le péricarpe de tomate en phase d'expansion cellulaire.

Mots-clés

Marquage, protéines, tomate, péricarpe, azote ^{15}N , isotope stable, incorporation, cinétique, fruit, serre, solution nutritive.

1 UMR 1332 - Biologie du fruit et Pathologie INRAE- Domaine Grande Ferrade, 33140 Villenave d'Ornon, France.

2 UMR1318 - Institut J-P Bourgin – INRAE, AgroParisTech, Université Paris Saclay, 78000, Versailles, France.

3 UMR GQE - Équipes PAPPISO/BASE (UPS, INRAE, CNRS, AgroPTech), Le Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France.

¹⁵N nitrogen labelling on tomato fruit pericarp using plants cultivated in semi-controlled green house conditions

Correspondence

marie-helene.andrieu@inrae.fr

Marie-Hélène Andrieu¹
Isabelle Atienza¹
Cédric Cassan¹
Anne Marmagne²
Daniel Just¹
Willy Bienvenut³
Yves Gibon¹
Sophie Colombié¹

Abstract.

Estimating the stability of proteins in plant tissue is an essential but complex question. Today there is very little work showing the feasibility of measuring the turnover of a large panel of plant proteins. Also, we attempted to incorporate labelled nitrogen (¹⁵N) into the tomato fruit by adding 5% Ca (¹⁵NO₃)₂ to the conventionally used nutrient solution. One month of culture later (with anthesis notation), four ¹⁵N incorporation kinetics were performed on fruits at different stages of development during 11 days. Assays of isotopic ratios carried out by EA-IRMS (Elementary Analysis - Isotopic Ratio by Mass Spectrometry) on insoluble residues after hydro-alcoholic extraction show a good incorporation of the labelling. Combined with total protein assays (Bradford), the results reveal the perfect linearity of ¹⁵N enrichment in tomato pericarp during cell expansion phase.

Keywords

Labelling, proteins, tomato, pericarp, ¹⁵N nitrogen, stable isotope, incorporation, fruit, greenhouse, nutrient solution.

1 UMR 1332 - Biologie du fruit et Pathologie INRAE- Domaine Grande Ferrade, 33140 Villenave d'Ornon, France.

2 UMR1318 - Institut J-P Bourgin - INRAE, AgroParisTech, Université Paris Saclay, 78000, Versailles, France.

3 UMR GQE - Équipes PAPPISO/BASE (UPS, INRAE, CNRS, AgroPTech), Le Moulon, 91190 Gif-sur-Yvette, France.

Introduction

La tomate (*Solanum lycopersicum L.*), originaire d'Amérique du Sud, est une plante herbacée sensible au froid, annuelle sous nos latitudes mais vivace sous climat chaud ou lorsqu'elle est cultivée en serre. C'est un fruit d'intérêt économique important puisqu'il est le premier fruit produit dans le monde avec 187 millions de tonnes. La France en produit 0,67 million de tonnes, loin derrière la Chine avec 65 millions de tonnes (chiffre FAO, 2020). Le Sud-Ouest est le deuxième bassin de production de tomates « plein champ » en France (Source : France AgriMer, 2017).

La tomate est depuis plus de trente ans un des modèles privilégiés à l'INRAE pour l'étude du développement des fruits charnus. Contrairement aux fruits à noyau (pêche, nectarine) et à pépins (pomme, poire), son développement est rapide (55 jours en moyenne, contre 150 pour la pomme). Alors que la majorité des fruits charnus ne fructifie qu'une fois par an, la tomate fructifie au bout de 4 mois environ (de la graine à la pleine maturité du premier fruit). La durée d'une génération, 12 à 15 fois moins longue que pour les espèces arboricoles, facilite les différentes approches de recherche menées sur fruits charnus, que ce soit en biologie moléculaire, cellulaire ou bien pour le phénotypage métabolique.

La variété commerciale « Moneymaker » est utilisée de façon privilégiée dans nos essais, plus particulièrement sur les expériences à grande échelle portant sur l'étude du métabolisme du fruit au cours de son développement. La dynamique de croissance de cette variété est bien décrite d'un point de vue morphologique (Figure 1) et physiologique (Biais et al., 2014).

Les données omiques (métabolomique, transcriptomique et protéomique) acquises sur les échantillons récoltés à neuf stades de développement ont permis d'élaborer différents modèles. Les premiers ont permis de mieux caractériser le métabolisme (Beauvoit et al., 2014 ; Colombié et al. 2015, 2016) et de prédire un idéotype en couplant les modèles de métabolisme et de croissance du fruit (Chen et al., 2019, 2021). En parallèle, les données de transcriptomique et de protéomique ont permis l'estimation des constantes de synthèse et de dégradation des protéines dans le fruit, rendant compte du turnover de plus de 1 000 protéines (Belouah et al., 2019). Ainsi, en moyenne, la durée de synthèse des protéines dans le péricarpe de tomate est estimée à 2 minutes, alors que la durée de vie moyenne des protéines est estimée à

11 jours. Ces prédictions, bien que comparables aux données obtenues avec des feuilles d'autres espèces (arabette et orge), voire avec des levures et des cellules de mammifère, restent néanmoins à valider. Ces durées sont estimées avec l'hypothèse que le turnover d'une protéine est constant au cours du développement du fruit, hypothèse forte que les expériences de marquage permettront de valider. Pour cela, l'objectif de ce travail est de suivre l'accumulation d'azote marqué dans les protéines spécifiquement identifiées dans le fruit, à différents stades de développement. La méthode d'enrichissement isotopique réalisée sur *Arabidopsis thaliana* en utilisant l'azote marqué ^{15}N , isotope stable de l'azote ^{14}N , ainsi que les modalités de traitement des données publiées par Li et al. en 2017 sont à transposer à notre modèle expérimental. L'enrichissement isotopique sur racines, tiges, feuilles et fleurs de tomate est possible avec l'azote ^{15}N (Schaff et al., 2008), mais jusqu'à présent aucune donnée n'existe sur fruit. Nous avons donc testé donc dans l'essai décrit ici, la possibilité de marquer les protéines du péricarpe de tomate au cours de son développement. Pour cela, une culture de tomate a été mise en place en serre, dans des conditions standard de production. L'azote ^{15}N a été incorporé à la solution nutritive lorsque les fruits, suffisamment nombreux, ont atteint le stade de développement souhaité. Les fruits récoltés et analysés ont permis de caractériser les dynamiques d'enrichissement, en estimant les vitesses d'incorporation de l'isotope en fonction de la durée de marquage et du stade de développement du fruit.

Matériels et Méthodes

Conditions environnementales semi-contrôlées

La serre de l'unité est composée de 3 compartiments régulés toute l'année par chauffage en hiver (chaudière à gaz) et système de refroidissement l'été (ouvrants de faitage motorisés et « cooling »). Le contrôle de l'hygrométrie est assuré par « fog system » avec des buses de brumisation alimentées par le réseau d'eau permutée produite sur place. L'intensité lumineuse, mesurée par des capteurs, est régulée par un système d'ombrage ou d'éclairage d'appoint (lampes LED). Le pilotage du climat de la serre est automatisé (Artic, Anjou Automation, Mortagne sur Sèvre, 85). La température varie de 23 °C à 28 °C le jour, et entre 16 et 19 °C la nuit ; l'hygrométrie varie de 60 % à 80 % HR. La photopériode est de 16 h/8 h (jour/nuit) avec complément d'éclairage si nécessaire. Un ané-

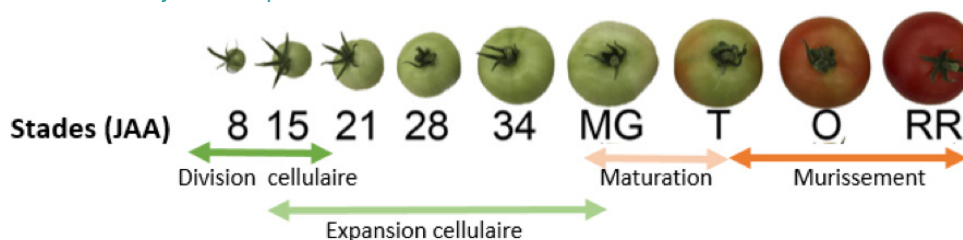


Figure 1. Illustration des quatre grandes phases de développement du fruit de tomate. Photos prises lors de la culture en condition standard de tomate Moneymaker, en 2010, à Invenio St Livrade (47). Les stades sont exprimés en nombre de jours après anthèse : JAA.

momètre permet la mise en sécurité de l'installation en cas de vent violent. L'enregistrement des données climatiques (température extérieure/intérieure, hygrométrie et intensité lumineuse) est effectué toutes les 2 minutes, et la sauvegarde réalisée sous le serveur de l'unité.

Modalités d'arrosage et de fertilisation

L'arrosage est piloté également par l'automate Artic. Les plantes sont arrosées avec une solution à pH 5,8, préparée à partir de solutions commerciales concentrées : LIQUOPLANT FD34 (code 0823), MAGPLANTS (code 0942), NITRAPOT (code 0937), CALPLANT (code 0936), SULFOPLANT (code 0941) de la SARL PLANTIN (Courthézon, 84) et du sulfate de potasse. Deux solutions diluées sont utilisées (CTIFL « Maîtrise de l'irrigation fertilisante : tomate sous serre et abris en sol et hors sol »). La première, appelée « Début de culture », contient des oligo-éléments et 3,5 mM KNO₃, 1 mM K₂SO₄, 2 mM KH₂PO₄, 6 mM Ca(NO₃)₂, 2 mM MgSO₄. Elle est utilisée jusqu'au stade de mise à fruit du premier bouquet, et favorise le développement végétatif. La seconde, appelée « Fin de culture », contient des oligo-éléments et 4 mM KNO₃, 1,5 mM K₂SO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 4 mM Ca(NO₃)₂, 1,5 mM MgSO₄. Elle est optimale pour le développement du fruit (Tableau 1).

La station d'arrosage permet d'assurer les dilutions, les ajustements de pH et la distribution des solutions appropriées aux 20 tables de la serre (solution de début de culture, de fin de culture ou eau de ville). Le premier arrosage de la journée se fait à l'eau à six heures, puis de 8 à 20 heures, toutes les deux heures, avec la solution nutritive appropriée. Le débit des goutteurs est de 2 litres/heure, ils arrosent 2 min, 8 fois par jour. Deux goutteurs par plante assurent un arrosage quotidien d'environ 500 ml.

ce stade environ 15 cm ; l'arrosage goutte à goutte est géré à ce moment-là par l'automate de la serre. La solution début de culture est maintenue jusqu'à l'apparition de la première fleur du premier bouquet de l'ensemble des plantes (7 juin 2021). Le changement de solution nutritive est avancé de 15 jours par rapport aux modalités standards pour que les premiers fruits se développent dans les mêmes conditions que les derniers récoltés ; 0,6 mM de nitrate de calcium non marqué est ajouté à la solution de fin de culture durant cette première période de suivi des plantes. Le pH est quotidiennement contrôlé et réajusté à 5,8 si nécessaire. L'arrosage avec la solution de ¹⁵NO₃ débute le 1^{er} juillet et dure 11 jours. La solution nécessaire aux 12 plantes marquées est alors entièrement refaite, celle des témoins ne change pas. L'arrosage à l'eau de ville (à 6 h) est arrêté.

La notation des anthèses se fait quotidiennement sur les 15 plantes. Les bouquets sont taillés pour éviter leur ramification. La première fleur de chaque bouquet est systématiquement enlevée dès son apparition car généralement disproportionnée (le pédoncule laissé apparent sur le bouquet permet d'en garder la trace). Les dates d'anthèse sont non seulement inscrites sur le tableau de suivi mais également sur l'étiquette du bouquet pour éviter toute erreur d'identification lors de la récolte.

Modalités de marquage ¹⁵N

Le nitrate de calcium, Ca(¹⁵NO₃)₂ - 98 % ¹⁵N (référence 488410 Sigma-Aldrich), est un des sels disponibles qui respecte au mieux l'équilibre électrochimique de la solution d'arrosage. Il est utilisé à 0,6 mM pour obtenir une solution nutritive enrichie de 5 % d'azote ¹⁵N. Le système d'arrosage est adapté pour permettre l'apport de solution de marquage sur nos tables sans perturber le reste du fonctionnement de

Tableau 1: Récapitulatif des concentrations molaires finales en minéraux majeurs des solutions de début et de fin de culture

	KNO ₃	K ₂ SO ₄	KH ₂ PO ₄	Ca(NO ₃) ₂	MgSO ₄
Début de culture	3,5 mM	1 mM	2 mM	6 mM	2 mM
Fin de culture	4 mM	1,5 mM	1,5 mM	4 mM	1,5 mM

Suivi expérimental de la culture

Une quinzaine de graines de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv Moneymaker) ont été semées directement en bloc de laine de roche (cube de 10 cm de côté), le 16 avril 2021. Arrosés quotidiennement par trempage dans la solution nutritive de début de culture, les jeunes plants sont déplacés au bout d'un mois et insérés dans leur support de culture en laine de roche de dimension 110 x 30 cm (« Prestige » de GRODAN), à raison de 3 par support. Les plants mesurent à

la serre (photo Figure 2). Deux cuves de 200 L servent de réservoir intermédiaire : une pour les plantes témoins et une pour les plantes marquées. Elles sont remplies de 160 litres de solution nutritive « fin de culture » préparée par l'automate. Les cuves sont complétées, dès le 7 juin, en Ca(NO₃)₂ non marqué pour que les plantes restent dans les mêmes conditions tout au long de l'expérience (plantes essais comme plantes témoins). Une pompe immergée dans chacune des deux cuves, pilotée par un programmeur, assure une fréquence d'arrosage standard.

Pour cette phase test et sans donnée préexistante sur la vitesse d'incorporation de l'azote ^{15}N dans le péricarpe de tomate, 4 modalités de marquage ont été testées simultanément (Figure 2) :

- 2 cinétiques d'incorporation à âge fixe (12 JAA et 26 JAA) : âges fixes des fruits pour le stade de récolte mais pas au démarrage du marquage, puisque à ce moment-là, ils ont entre 11 et 1 JAA et de 25 à 15 JAA respectivement. Par exemple, un fruit récolté à 12 jours, marqué 11 jours, n'a qu'un jour au démarrage du marquage, alors qu'un fruit marqué 1 jour, doit être âgé de 11 jours (en début de marquage) pour être récolté à 12 jours.
- 2 cinétiques d'incorporation à âge glissant lors de la phase de grandissement du fruit, entre 8 JAA et 19 JAA, puis entre 21 JAA et 32 JAA pour le stade de récolte des fruits. Les fruits sont donc âgés de 8 et de 21 JAA respectivement au début du marquage.

Aux 7 prélèvements effectués au cours de cette période de marquage, quelques temps intermédiaires sont rajoutés.

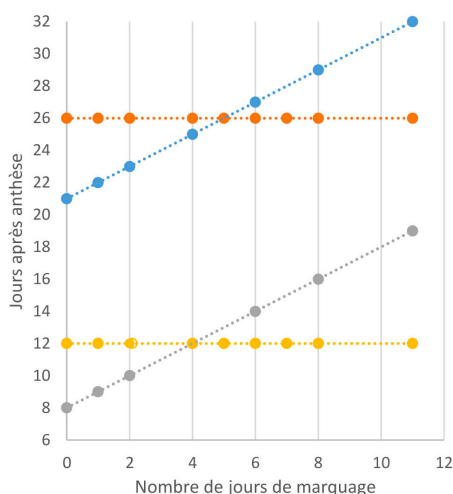


Figure 2. À gauche : Photo du dispositif expérimental ; À droite : Schéma récapitulatif des 4 modalités de marquage à l'azote ^{15}N . Les points matérialisent les jours de prélèvement. En jaune et orange, 2 cinétiques à âge fixe (12 JAA et 26 JAA) ; en gris et bleu, 2 cinétiques respectivement de 8 à 19 JAA et de 21 à 32 JAA.

Récolte des échantillons

Les échantillons sont constitués d'un pool de 3 à 6 fruits correspondant chacun au stade et au jour de marquage souhaité. Les fruits d'un même pool sont récoltés sur des plantes différentes pour limiter les effets de bord. Tous les prélèvements sont effectués à horaire fixe : entre 12 et 13 heures. Les mesures biométriques (diamètres, hauteur et poids) sont réalisées sur chaque fruit (185). Le tissu à analyser (échantillon d'environ 10 x 20 mm) est prélevé dans la zone équatoriale du péricarpe (Figure 3). Le gel et les graines sont éliminés, hormis pour quelques échantillons qui permettront le contrôle du marquage dans ces tissus. Le péricarpe prélevé est rapidement redécoupé, en lamelles d'environ 2 x 10 mm,

au scalpel sur boîte de pétri propre. Ces lamelles sont plongées immédiatement dans l'azote liquide, dans une fiole en polypropylène (Zinsser polyvial V 20 ml). Le remplissage de la fiole ne doit pas dépasser la moitié de sa capacité pour permettre le broyage homogène de l'échantillon qu'elle contient (broyage au broyeur à billes, directement dans la fiole).

Extraction et dosage des protéines

Les étapes d'extraction hydro-alcoolique sur poudre fraîche, ainsi que le dosage des protéines à partir du culot d'extraction se font grâce au système robotisé de phénotypage métabolique à haut débit de la plateforme « Bordeaux Métabolome » : MLSTARlet 3473 d'HAMILTON.

Le broyeur Geno Grinder 2010 (Spex Sample Prep) permet le cryo-broyage simultané de 12 échantillons. L'ajustement de la fréquence et la durée du broyage permettent d'adapter les conditions à chaque type d'échantillon. Les échantillons de tomate conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sont préalablement refroidis à l'azote liquide dans la Cryo Station 2600 (Spex Sample Prep), puis sont broyés 1 min à 25 Hertz avec 2 billes d'acier de 10 mm de diamètre.

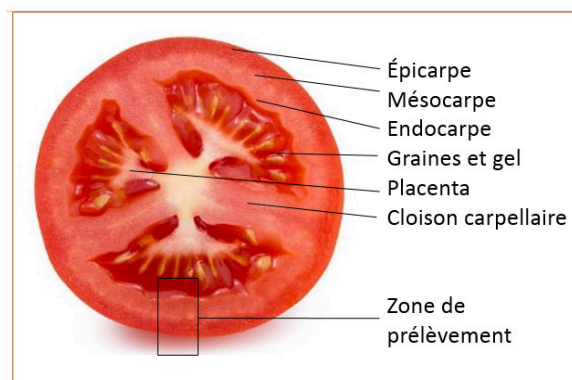


Figure 3. Coupe transversale équatoriale du fruit de tomate, description générale de son anatomie et visualisation de la zone d'échantillonnage.

L'extraction hydro-alcoolique permet de séparer les composés solubles (sucres, acides organiques, acides aminés, sels minéraux...) des composés insolubles (paroi, amidon et protéines). Trois répliquats d'environ 40 mg de poudre fraîche, pesés précisément en tubes « Micronic » 1,1 ml (MP 32033L, nbsscscientific.com), sont extraits par 3 incubations successives de 20 minutes à 80 °C. Les 2 premières se font avec 250 puis 150 µl d'éthanol à 80 % ; la dernière se fait avec 250 µl d'éthanol à 50 %. Entre chaque incubation, une centrifugation de 5 minutes à 1 600 g (Eppendorf Centrifuge 5810R) permet de prélever les surnageants. Cette extraction est assistée par un robot de pipetage équipé d'une tête à 96 canaux (Hamilton Star). L'ensemble des fractions « culots » sont lyophilisées.

La détermination des protéines est effectuée sur 2 des 3 répliquats extraits en incubant les culots précédemment lyophilisés dans 400 µl de 0,1 M NaOH à 95 °C pendant 30 min (agitation vigoureuse avant incubation). Après 5 min de centrifugation à 1 600 g, 8 µl de surnageant sont prélevés et rajoutés à 180 µl de réactif Bradford Ready-to-use (SIGMA, ref : B6916) préalablement distribué dans une microplaque 96 puits en polystyrène (Greiner bio-one, 655101). La lecture de DO se fait à 600 nm (Spectrophotomètre SAFAS MP96) après 10 min d'incubation à température ambiante. La gamme étalon est faite en utilisant l'albumine sérique bovine (Roche, ref: 10735078001), diluée dans une solution NaOH à 0,1M en partant d'une solution mère à 10 mg/ml (Tableau 2 et Figure 4).

Cette gamme est réalisée dans les mêmes conditions de mesure que les échantillons. Les teneurs en protéines sont données par la formule suivante (la pente de la gamme étalon est exprimée en Abs/µg de protéine par puit) :

$$\mu\text{gprotéine/mgMF} = \frac{\text{Abs}_{600} - \text{Intercept}x0}{\text{pente}} * \left(\frac{400\mu\text{l}}{8\mu\text{l}}\right) * \frac{1}{\text{mgMF}}$$

avec : MF pour Matière Fraîche

avec : intercept x0 : valeur de y pour x=0, donnée par la droite de régression de la gamme étalon : 0,2486.

Détermination du rapport Isotopique

Après extraction hydro-alcoolique et lyophilisation, les culots obtenus sont transférés en capsules d'étain (Thermo Scientific, ref : 210 06400 SN/165742) et envoyé à l'IJPB (INRAE Versailles) pour la détermination de leurs rapports isotopiques. Chaque lyophilisat est pesé au 10^e de milligramme sur une balance de précision (Sartorius modèle Cubis MCE). Les dosages s'effectuent sur des quantités de résidu comprises entre 0,5 et 2,6 mg (idéalement entre 1 et 2 mg). L'abondance en azote ¹⁵N est mesurée avec un analyseur élémentaire organique (Flash 2000 de Thermo Fisher Scientific) couplé à un spectromètre de masse isotopique (Delta V Advantage IRMS de Thermo Fisher Scientific). Les résultats exprimés en pourcentage d'atome ¹⁵N (% A) sont donnés par la formule (Marmagne et al., 2020) :

$$\% A = 100 * ({}^{15}\text{N}) / ({}^{15}\text{N} + {}^{14}\text{N})$$

Résultats et discussion

Suivi de la récolte

L'optimisation des modalités de marquage s'est faite en tenant compte du nombre d'antheses par jour et de l'apparition de maladies de type nécrose apicale. En effet, les fortes chaleurs induisent chez certaines plantes non seulement l'ap-

Tableau 2. Modalités de préparation de la gamme étalon à la BSA pour le dosage des protéines.

	10 mg/ml	1 mg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62.5 µg/ml
Volume required		100 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
NaOH 100 mM		900 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Final volume		1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

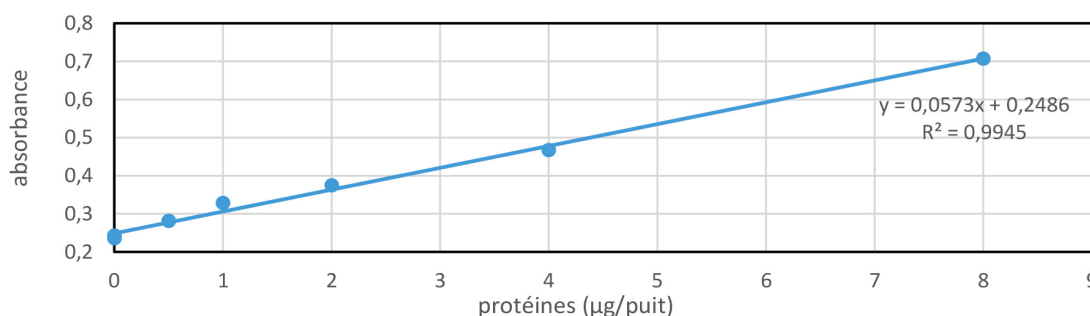


Figure 4. Droite d'étalonnage nécessaire au calcul des protéines (quantité exprimée en µg par puit)

parition de nécrose apicale mais également l'avortement du tout jeune fruit. Les conditions d'ensoleillement variables ont permis d'obtenir une huitaine de fleurs par jour en moyenne, sur 12 plantes, avec deux pics d'apparition les 16 et 23 juin (Figure 5) ; mais le manque de soleil a globalement ralenti la floraison ainsi que le développement des fruits.

croissance (phase d'expansion cellulaire). Théoriquement, le fruit continue à grossir en taille jusqu'au stade vert mature (42 JAA) et en poids jusqu'au stade de pleine maturité (55 JAA).

La figure 6 représente l'évolution du poids des fruits au cours de leur développement. La grande variabilité de masse pour un âge donné n'est pas surprenante. Pour tenir compte de cette hétérogénéité, chaque échantillon est constitué d'un mélange de 3 à 6 fruits aléatoirement choisis. Compte tenu du nombre de prélèvements nécessaires au suivi des cinétiques de marquage, il n'a pas été possible de réaliser des réplicats biologiques. Le dernier stade récolté (32 JAA) correspond à un fruit vert situé en fin de phase exponentielle de

Concentration en protéines dans le péricarpe de fruit

Le dosage des protéines est réalisé sur au moins deux des trois réplicats techniques effectués sur tous les échantillons récoltés. Les résultats obtenus (Figure 7) mettent en évidence les concentrations élevées en protéines aux stades précoces de développement du fruit (environ 10 mg par gramme de matière fraîche à 6 JAA) et témoignent d'une forte activité métabolique lors de la phase de division cellulaire. Ces teneurs décroissent rapidement car le fruit grandit en accumulant de l'eau (plus rapidement que de la matière sèche) diluant ainsi

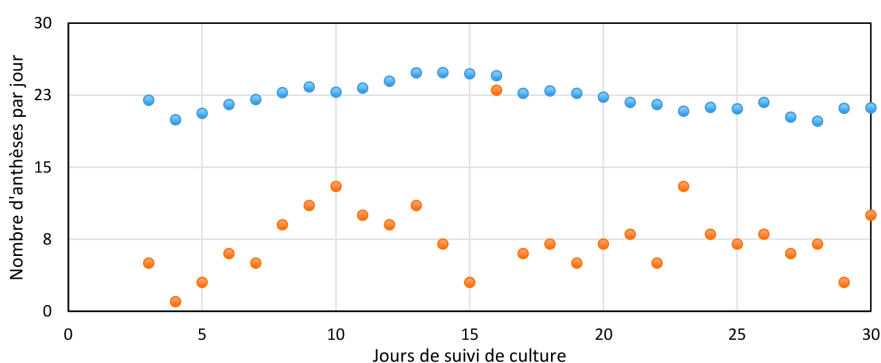


Figure 5. Suivi de la culture de tomate cv. « Moneymaker » en condition semi-contrôlée du 3 juin au 2 juillet 2021. En orange, le nombre d'antheses par jour pour 12 plantes ; en vert, la température moyenne calculée sur 24 heures.

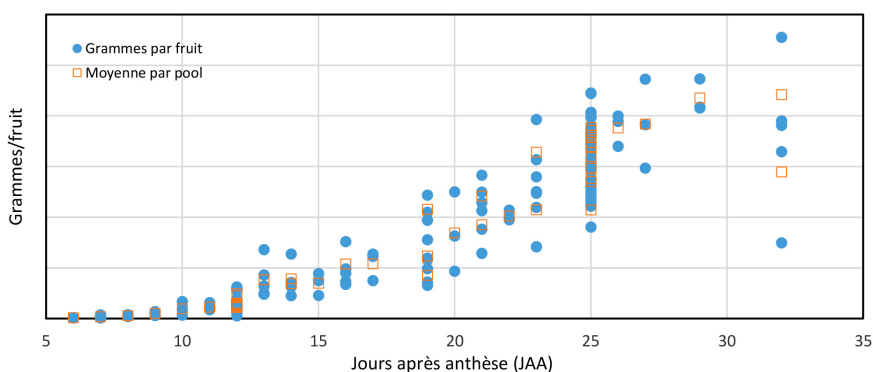


Figure 6. Croissance des fruits de tomate cv. « Moneymaker » récoltés entre le 1er et le 12 juillet 2021. En bleu : masse du fruit ; en orange : masse moyenne par pool de fruits.

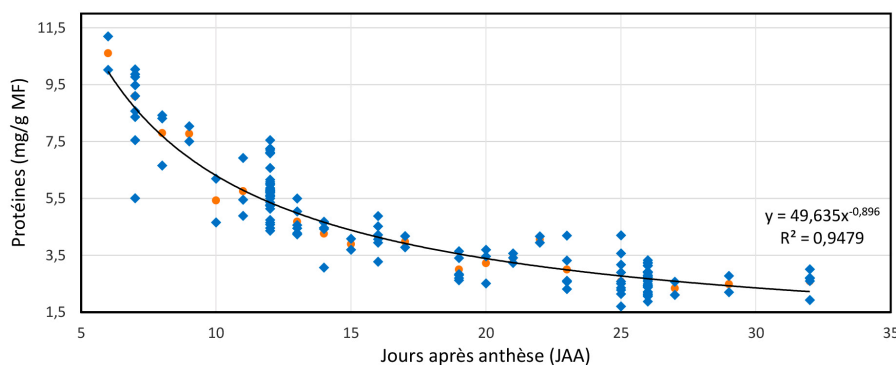


Figure 7 : Évolution des protéines totales dans le péricarpe de tomate entre 5 et 32 jours après anthèse. La courbe de tendance est ajustée sur les moyennes des mesures calculées pour chaque temps (rond orange).

l'ensemble des métabolites. La teneur en protéines au cours du développement du fruit est bien décrite par la fonction mathématique de type puissance (choix parmi les options de courbes de tendance proposées par le tableur Excel). Elle peut s'écrire sous la forme :

$[proteines] = 49,635 (\text{âge du fruit})^{0,896}$, avec un coefficient de détermination R^2 de 0,95 (Figure 7).

Détermination du Rapport $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ dans les échantillons

Les dosages sont effectués sur un seul réplicat biologique (et technique) à partir du lyophilisat des résidus insolubles obtenus après extraction hydro-alcoolique. Ils permettent de caractériser l'incorporation de l'azote ^{15}N dans le péricarpe lorsque les plantes sont arrosées avec une solution nutritive standard partiellement complétée en azote lourd (5 %). L'assimilation au cours des 7 arrosages quotidiens commence par le système racinaire, en passant par la tige, les feuilles ; elle se poursuit jusqu'au fruit, en s'incorporant aux protéines, aux acides aminés et aux acides nucléiques. La Figure

8 montre que l'azote ^{15}N s'accumule de façon linéaire dans le péricarpe à la vitesse de 0,2 % par jour à 12 JAA, et trois fois moins vite pour les fruits à 26 JAA (0,07 % par jour). Les dosages effectués sur deux échantillons de gel de fruits après 8 jours de marquage laissent supposer que les schémas d'assimilation dans ces tissus sont identiques à ceux du péricarpe. La linéarité de l'incorporation de l'azote ^{15}N est moins flagrante pour les fruits en cours de grandissement (Figure 9), car le phénomène de dilution lié au grandissement du fruit croise celui de l'accumulation du traceur. Sur ces deux cinétiques, deux mesures ont été réalisées sur le tissu du gel après huit jours de marquage. Les résultats sont du même ordre de grandeur que ceux du péricarpe et confirment les observations précédentes.

Pour vérifier la linéarité de l'incorporation du marquage dans les fruits en croissance, la concentration en protéines est prise en compte. La fonction d'ajustement des protéines permet d'exprimer les résultats en pourcentage d'incorporation d'azote ^{15}N par mg de protéines, pour les 2 cinétiques (Figure 10). L'incorporation, absolument linéaire entre 8 et 19 JAA

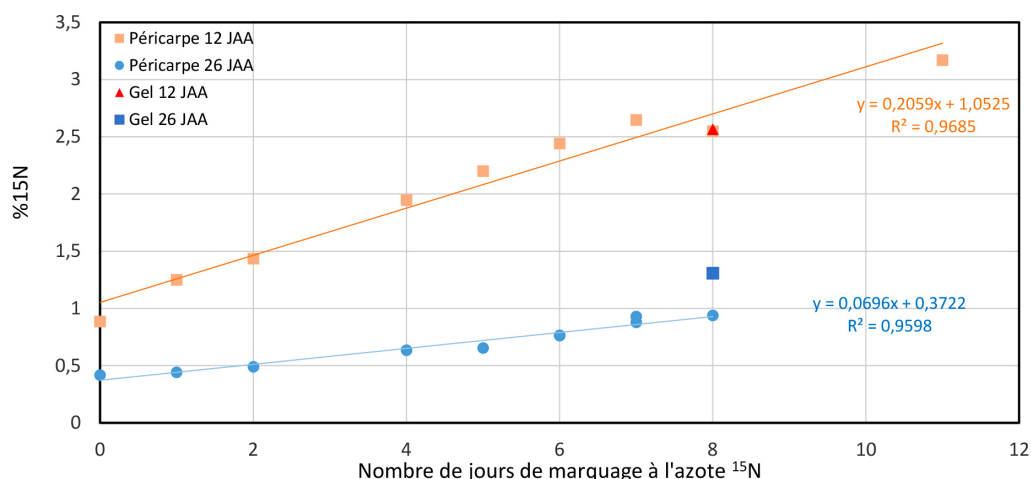


Figure 8. Pourcentage d'incorporation d'azote ^{15}N dans le péricarpe de fruit de tomate à âge fixe : en jaune et bleu clair respectivement à 12 et 26 JAA. Mesures d'incorporation dans le gel après 8 jours de marquage à 12 et 26 JAA (triangle rouge et carré bleu foncé).

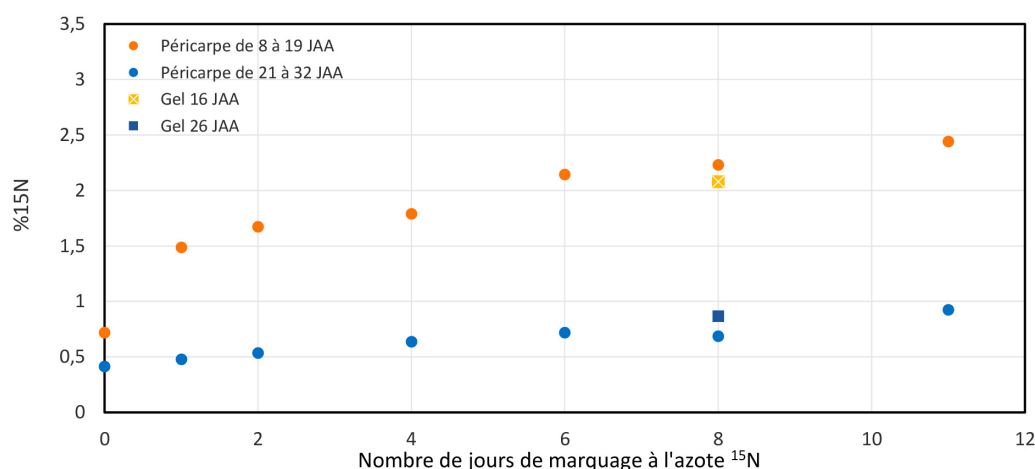


Figure 9. Pourcentage d'incorporation d'azote ^{15}N dans le péricarpe de fruit de tomate en cours de développement : de 8 à 19 et de 21 à 32 JAA en orange et bleu respectivement. Les deux mesures sur gel, au bout de huit jours de marquage, sont représentées par un carré jaune clair, un autre bleu foncé.

($R^2=0,99$), le reste entre 21 et 32 JAA ($R^2=0,95$). La vitesse d'incorporation dépend du stade de maturité ; elle est deux fois moins rapide pour les fruits les plus âgés (0,025 au lieu de 0,05 % ^{15}N /mg protéine et par jour de marquage), témoignant de la baisse de la synthèse des protéines, certainement autour de 19-21 JAA. Ces observations sont confirmées par

analysée par EA- IRMS. La figure 12 montre, qu'après huit jours de marquage, le gel et le péricarpe sont enrichis de la même manière, que ce soit dans la fraction soluble ou dans la fraction insoluble. Par ailleurs, à 12 JAA, alors que l'incorporation à ce stade est la plus rapide, un très faible enrichissement est détecté dans les fractions solubles par rapport à l'abon-

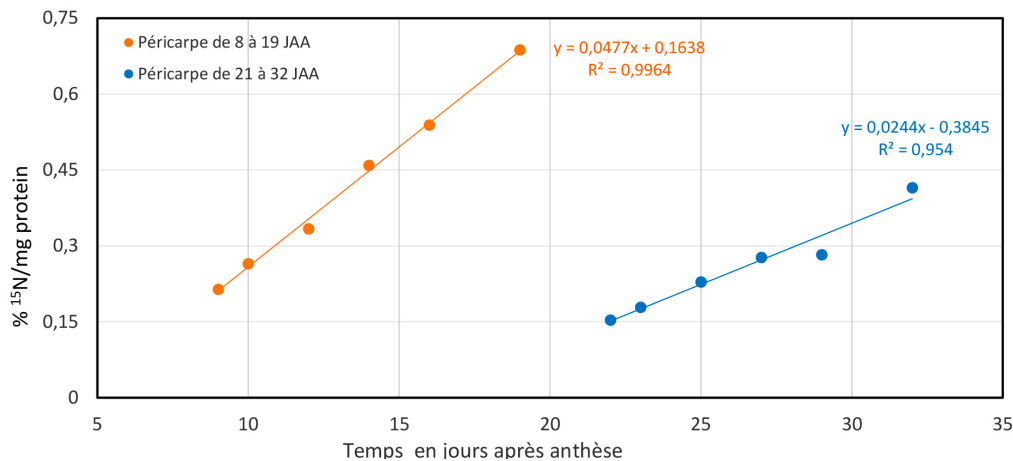


Figure 10: Pourcentage d'incorporation de l'azote ^{15}N par mg de protéines dans le péricarpe de tomate : en orange et bleu, de 8 à 19 et 22 à 32 JAA respectivement.

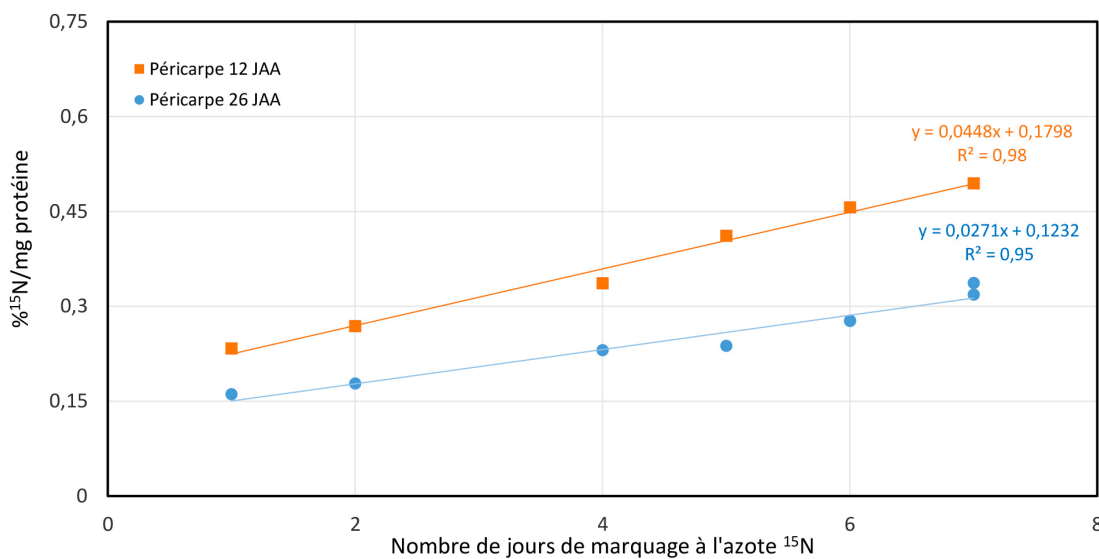


Figure 11: Pourcentage d'incorporation de l'azote ^{15}N par mg de protéines dans le péricarpe de tomate : en jaune et bleu clair à 12 et 26 JAA respectivement.

les résultats présentés sur la figure 11 où les cinétiques d'enrichissement à âge fixe sont, elles aussi, calculées en tenant compte des teneurs en protéines. Les vitesses d'incorporation sont similaires (0,027 et 0,045 % ^{15}N par mg de protéines et par jour de marquage (respectivement pour les fruits à 12 et 26 JAA).

Le niveau d'enrichissement dans les fractions contenant les composés « solubles » (surnageant hydro-alcoolique) est également mesuré, car la vacuole peut éventuellement accumuler des ions nitrate, ammonium ou bien encore des acides aminés libres. Après séchage à l'évaporateur rotatif sous vide, chaque fraction est reprise à l'eau mQ (qsp 40 μl), déposée dans une capsule d'étain, séchée, pesée au $1/10^{\text{e}}$ de mg et

dance naturelle qui se situe aux alentours de 0,5 % dans les échantillons. Des résultats similaires (non présentés ici) ont été obtenus par des mesures ponctuelles à des stades plus avancés. Ces résultats laissent penser que l'enrichissement dans ces conditions expérimentales se fait de manière optimale. Une accumulation de nitrate dans les compartiments de réserve aurait au contraire révélé une réaction d'adaptation à un stress abiotique.

Pour finir, un dernier contrôle est effectué par EA-IRMS sur la solution nutritive utilisée dans cet essai afin de déterminer sa teneur exacte en azote ^{15}N . Alors que nous l'attendions à 5 %, elle est de fait, mesurée à 6,0782 % (+/- 0,0688).

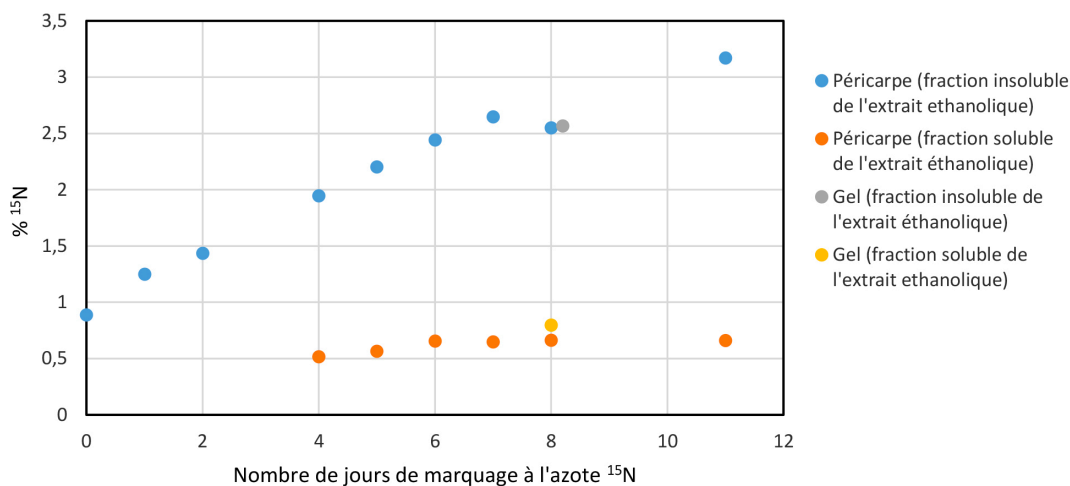


Figure 12. Pourcentage en azote ^{15}N dans le fruit à 12 JAA : en orange et jaune pour la fraction soluble et en bleu et gris pour la fraction insoluble (respectivement péricarpe et gel).

Conclusion

Le marquage des protéines du fruit de tomate est facilement réalisable en utilisant comme traceur l'isotope lourd de l'azote. Il est ajouté à la solution nutritive classiquement utilisée pour la culture en serre sous forme de nitrate de calcium marqué à 98 % sur ses deux atomes. L'enrichissement, comme souhaité, n'est que partiel puisqu'il se fait avec une solution à 6,075 % d'azote ^{15}N (teneur réelle mesurée). Cette incorporation est un phénomène robuste puisque les 4 cinétiques donnent des résultats cohérents et similaires. Elle se fait de manière linéaire avec des vitesses dépendantes du stade de développement (0,5 % d'incorporation par jour en début de phase d'expansion cellulaire, contre 0,25 % en fin

de phase). La durée du marquage de 11 jours n'a pas été suffisante pour atteindre les paliers de saturation d'incorporation attendus à 6,075 %. En effet, le maximum d'incorporation se situe à 3,2 % après 11 jours de marquage sur fruits âgés de 12 jours. Le fruit ne semble pas stressé par ces conditions de marquage. Cette expérience permet d'envisager la suite des analyses par LC-MS-MS en privilégiant, dans un premier temps, les cinétiques à âge fixe. Elles n'induiront que peu d'hétérogénéité liée à l'effet matrice du tissu, notamment gênant pour le traitement des spectres de masse. Les stades développementaux ciblés pour nos prochains essais seront ceux de la phase de division cellulaire (entre 5 et 8 JAA) et de la maturation (entre 40 et 45 JAA). ■

Remerciements

Nous remercions le département BAP de l'INRAE pour son soutien financier au projet PROOFER (2021-2023) pour lequel ces travaux ont été réalisés.

Références

Beauvoit BP, Colombié S, Monier A, Andrieu M-H, Biais B et al. (2014). Model-Assisted Analysis of Sugar Metabolism throughout Tomato Fruit Development Reveals Enzyme and Carrier Properties in Relation to Vacuole Expansion. *The Plant cell*, American Society of Plant Biologists (ASPB), 26 (8), epub ahead of print. DOI : 10.1105/tpc.114.127761. Disponible à : hal-01058814.

Belouah I, Nazaret C, Pétriacq P, Prigent S, Bénard C et al. (2019). Modeling Protein Destiny in Developing Fruit. *Plant Physiology*, American Society of Plant Biologists, 180 (3), pp.1709-1724. DOI: 10.1104/pp.19.00086. Disponible à : (hal-02327302v1).

Biais B, Bénard C, Beauvoit B, Colombie S, Prodhomme D et al. (2014). Remarkable reproducibility of enzyme activity profiles in tomato fruits grown under contrasting environments provides a roadmap for studies of fruit metabolism. *Plant Physiology*, American Society of Plant Biologists, 164, pp.1204-1221. DOI:10.1104/pp.113.231241. Disponible à : (hal-02639362v1).

Chen JL, Beauvoit BP, Colombie S, Roch L, Belmys Cakpo C et al. (2019). An integrated fruit model toolkit: combining fruit biophysical processes with central carbon metabolism. *Symposium on Advanced Technologies and Management for Innovative Greenhouses: GreenSys2019*, Angers, France. Pp.401-410. DOI : 10.17660/ActaHortic.2020.1296.52. Disponible à : hal-03125090.

Chen JL, Beauvoit BP, Génard M, Colombie S, Moing A et al. (2021). Modelling predicts tomatoes can be bigger and sweeter if biophysical factors and transmembrane transports are finetuned during fruit development. *New Phytologist*, Wiley, 230, pp.1489-1502. DOI: 10.1111/nph.17260. Disponible à : (hal-03152042v1).

Colombie S, Nazaret C, Bénard C, Biais B, Mengin V et al. (2015). Modelling central metabolic fluxes by constraint-based optimization reveals metabolic reprogramming of developing *Solanum lycopersicum* (tomato) fruit. *Plant Journal*, Wiley, 81 (1), pp.24-39. DOI: 10.1111/tbj.12685. Disponible à : (hal-01445680v1).

Colombie S, Beauvoit BP, Nazaret C, Bénard C, Vercambre G et al. (2016). Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modelling. *New Phytologist*, Wiley, 213 (4), pp.1726-1739. DOI: 10.1111/nph.14301. Disponible à : (hal-01445653v1).

CTIFL, Maîtrise de l'irrigation fertilisante : tomate sous serre et abris en sol et hors sol / CTIFL ; réalisation, Michel Letard, Patricia Erard, Benoît Jeannequin, avec la collaboration de S. Le Quillec, M. Musard, B. Navez, et al. <http://ark.bnf.fr/ark:/12148/cb35813332t>.

Li L, Nelson CJ, Trösch J, Castleden I, Huang S, Millar AH. (2017). Protein Degradation Rate in Arabidopsis thaliana Leaf Growth and Development. *Plant Cell*. (2):207-228. DOI: {10.1105/tpc.16.00768}. Epub 2017 Jan 30. PMID: 28138016; PMCID: PMC5354193.

Marmagne A, Jasinski S, Fagard M, Bill L, Guerche P et al. (2020) Post-flowering biotic and abiotic stresses impact nitrogen use efficiency and seed filling in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, Oxford University Press (OUP), 71 (15), pp.4578-4590. DOI: 10.1093/jxb/eraa011. Disponible à : (hal-02942993v1).

Schaff JE, Mbeunkui F, Blackburn K, Bird DM, Goshe MB. SILIP: a novel stable isotope labeling method for in planta quantitative proteomic analysis. *Plant J*. (2008) Dec;56(5):840-54. Doi : {10.1111/j.1365-313X}. PMID: 18665915.

https://rnm.franceagrimer.fr/bilan_campagne?menu=derniers

<https://tomatedemarmande.fr/en-chiffres>

<https://www.fao.org>



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>.

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.