



l'intelligence du vivant
structure fédérative de recherche

Demande de bourse de thèse

Dossier de proposition de sujet de thèse 2017

Bourse JH FABRE – Ville d'Avignon

à transmettre pour le 5 avril
à claire.blusztajn@univ-avignon.fr

Laboratoires impliqués	UMR Qualisud
Titre de la thèse*	Elaboration de corrélations entre marqueurs non destructifs du stress oxydatif et teneurs en composés secondaires
Résumé (10 – 15 lignes)	
<p>Les teneurs en microphytonutriments, auxquelles sont attribués les effets santé et la qualité organoleptique des fruits et légumes, peuvent être modulées par l'application de stress photooxydatifs modérés. Le pilotage de la qualité peut alors devenir accessible aux acteurs de la filière et permettre la construction d'itinéraires techniques innovants centrés sur les stress, à la condition de disposer de marqueurs non destructifs, faciles à obtenir, exploitables à la fois pour qualifier les stress et pour prédire le potentiel production des composés secondaires. Par ailleurs, pour que l'amélioration de la qualité soit perçue par le consommateur, il est essentiel, que les teneurs en composés secondaires soient maintenues au maximum après la récolte, jusqu'à l'acte de consommation.</p> <p>L'objectif de cette thèse est de tester l'hypothèse selon laquelle les paramètres liés aux flux d'énergie autour et dans la machinerie photosynthétique, notamment ceux déduits des courbes d'induction de la fluorescence maximale de la chlorophylle <i>a</i>, peuvent fournir ces marqueurs opérationnels au cours de la croissance des plantes. L'utilisation des techniques 'omiques', transcriptomique et métabolomique permettra de valider ces marqueurs, d'identifier les voies métaboliques qui leur sont associées et ainsi de mettre en évidence les leviers environnementaux les plus pertinents, qui pourront être exploités au niveau agronomique. Le suivi de l'évolution des teneurs en phytomicronutriments cours de la conservation après récolte, permettra également de valider que l'amélioration de la qualité se maintient jusqu'à la consommation des végétaux.</p>	
Enjeu structurant pour l'axe Agro&Sciences de l'UAPV	
<p>Le projet de thèse s'insère directement dans l'axe 2a « effets des facteurs environnementaux et génétiques sur la qualité des produits végétaux » de la Structure Fédérative de Recherche TERSYS. Par rapport aux thèmes reconnus prioritaires pour 2015 par la ville d'Avignon, le projet de thèse se situe à l'interface du thème « Santé, bien-être et alimentation méditerranéenne » (notamment par le positionnement sur les microphytonutriments) et du thème « Agriculture durable » (par le positionnement sur la limitation des pertes et gaspillages).</p> <p>Le projet est structurant pour l'axe de l'UAPV car il a pour objectif de créer des liens entre les conditions environnementales de croissance des végétaux, les conditions de conservation après récolte et leur composition en phytomicronutriments et est donc en relation avec les effets 'santé'. Il a également une dimension environnementale. En effet, l'amélioration de la concentration en composés secondaires chez les plantes cultivées possède un triple enjeu, le premier porte sur la stimulation naturelle de la défense des plantes et donc la diminution ou la suppression de l'utilisation de pesticides, le second sur l'amélioration de la qualité micronutritionnelle des produits récoltés (en tout cas pour les fruits et les légumes), le troisième sur l'amélioration de la durée de conservation des produits et donc la limitation des pertes et gaspillages. A travers ces trois enjeux,</p>	

ce projet de thèse s'insère directement dans l'Opération d'Intérêt Régional (OIR) *Naturalité* du Schéma Régional de Développement Economique, d'Innovation et d'Internationalisation (SRDEII).

Il s'insère également parfaitement à l'interface des axes 1 et 2 de l'UMT IQUAR, UMT labélisée récemment entre le Ctifl, l'UAPV et l'INRA PACA.

*Le titre doit pouvoir être publié sur le site web de l'ED et de la SFR

Encadrement (Le directeur de thèse doit être rattaché à l'ED 536 de l'UAPV, condition non obligatoire pour le co-directeur)

Responsable(s) de la thèse	Huguette Sallanon (directeur)	HDR ? (O/N)	O
Noms et labos d'appartenance			
Directeur(s) de la thèse (si différent du(des) responsable(s))	Laurent Urban (co-directeur)	HDR ? (O/N)	O
Nombre de doctorants dirigés par le(s) responsable(s) de la thèse	1	Nombre de post-docs ou CDD dirigés par le(s) responsable(s) de la thèse	1

Description du projet (4 pages maximum)

Enjeux socio-économiques et scientifiques pour l'axe Agro&Sciences de l'UAPV

Enjeu socio-économiques

Indépendamment des études médicales épidémiologiques et physiologiques, qui se multiplient ces dernières années et tendent à démontrer un lien entre la composition en microphytonutriments et les « bénéfices santé » des végétaux, l'alimentation méditerranéenne jouit depuis longtemps dans ce domaine d'une excellente réputation auprès du consommateur mondial. Le contexte géo climatique particulier du bassin méditerranéen, très propice à la production de fruits et légumes, est source de contraintes environnementales susceptibles d'en améliorer la qualité. Cela suggère l'existence d'une demande potentielle capable d'entraîner le développement d'un important marché de produits végétaux méditerranéens frais ou transformés, ou de compléments alimentaires naturels en phase avec les nouvelles attentes sociétales. L'évolution du tissu agro-industriel provençal semble par ailleurs indiquer que dans un contexte de marchés toujours plus ouverts, l'avantage compétitif des territoires de production réside désormais dans une production de qualité et de haute valeur ajoutée (cf. la clémentine de Corse qui bénéficie d'une IGP).

La constitution de filières agroalimentaires innovantes, capables de capter le potentiel de production exceptionnel du territoire et de le valoriser au mieux auprès du consommateur est donc possible, à condition de pouvoir garantir la qualité des produits tout au long de la chaîne de valorisation, de la production jusqu'au consommateur. De plus, la composition micronutritionnelle évolue considérablement après la récolte au cours de la conservation, généralement dans le sens d'une détérioration. Il ne suffit donc pas que l'amélioration de la qualité ait lieu au cours de la production et que les végétaux soient de 'bonne qualité' à la récolte, il est indispensable qu'ils le restent durant le temps entre la récolte et la consommation, temps qui varie de quelques jours à quelques mois.

Dans le cadre de ces enjeux, l'objectif appliqué est de fournir des outils « simples » d'évaluation de la production, pour qualifier aussi bien les catégories de produits en fonction de leur teneur en microphytonutriments, que les itinéraires techniques avant et après récolte qui vont permettre leur valorisation systématique dans des filières ayant la plus haute valeur ajoutée possible.

Enjeux scientifiques

Il est connu que les stress photooxydatifs modérés, induits par le déséquilibre entre la quantité d'énergie entrant dans les feuilles sous forme de flux de photons et la quantité d'énergie consommée par la photosynthèse, peuvent stimuler le métabolisme secondaire des plantes et donc modifier la composition des végétaux en composés secondaires et potentiellement améliorer leur valeur santé. Cependant, bien que certains liens aient été mis ponctuellement en évidence, la connaissance des voies métaboliques impliquées et leur régulation sont encore insuffisamment connues pour pouvoir être utilisées agronomiquement. Par ailleurs, dans l'intervalle de temps entre la récolte et la consommation, le métabolisme évolue de manière particulière et il n'existe, à notre connaissance, que très peu ou pas de données sur l'influence d'un stress oxydatif sur l'évolution des teneurs en micronutriments après la récolte.

La lumière est par définition la source de stress photooxydatif. Cependant, lorsque l'intensité lumineuse est modérée, le flux d'énergie entrante sous forme de photons est évacué normalement sous forme de flux d'électrons pour la photosynthèse et la photorespiration et le risque de formation d'Espèces Réactives de l'Oxygène (EROs) (et donc l'effet stimulant sur la production de composés secondaires) est faible. Le stress photooxydatif apparaît lorsque l'intensité lumineuse est trop élevée par rapport à l'activité de la Rubisco, ce qui est souvent liée, en conditions de production, à l'existence d'un autre stress, la plupart du temps du à une restriction de l'apport en eau. Les réponses adaptatives au niveau du fonctionnement de la machinerie photosynthétique varient donc en fonction de la nature du stress, de son intensité, de sa durée et de sa répétition dans le temps et doivent être appliquées sans effet notable sur la production ou la qualité en conservation. Tous les stress ne sont pas identiquement efficaces et ceux que nous recherchons doivent avoir un effet stimulateur des composés secondaires et non délétère pour le métabolisme cellulaire. On peut donc formuler l'hypothèse qu'en analysant les réponses imposées par les stress en termes de réajustement des flux d'énergie et d'électrons autour et dans la machinerie photosynthétique, on obtiendra à la fois des signatures des stress, de leur intensité, de leur durée et de leur répétition dans le temps et des indications sur le potentiel de production de composés secondaires exploitables à des fins de prévision et de pilotage.

Question de recherche proposée au candidat

L'objectif scientifique de la présente thèse est de tester si des corrélations simples peuvent être établies entre les marqueurs non destructifs, issus de l'analyse de la fluorescence de la chlorophylle et les teneurs en composés secondaires. La recherche de ces corrélations sera faite dans des conditions générant du stress photooxydatif. Une étude de transcriptomique, menée simultanément, nous donnera des informations sur les voies impliquées dans la perception du stress, la signalisation et la régulation de la synthèse des composés secondaires.

Hypothèses de travail

Nous proposons dans le cadre de cette thèse de tester l'hypothèse selon laquelle i) la photosynthèse elle-même représente le récepteur majeur des grandes variations environnementales auxquelles les plantes sont soumises, notamment des stress, ii) qu'elle joue un rôle de premier plan dans le contrôle de la synthèse des composés secondaires via la production d'EROs et iii) que son analyse peut fournir des jeux de marqueurs, très aisés à mesurer, y compris par des producteurs ou des acteurs de la conservation, en exploitant les outils de mesure de la fluorescence de la chlorophylle a, dans une perspective de pilotage de la production de composés secondaires par les plantes.

Par ailleurs, les nouvelles approches 'omiques' nous permettront d'acquérir une vision globale des réorientations du métabolisme engendrées par les stress imposés. L'étude de transcriptomique nous donnera des informations sur les voies de signalisation et métaboliques impliquées dans la réponse aux stress oxydatifs. L'étude de métabolomique qui prolonge les méthodes de chimie analytique par des analyses non ciblées et exploratoires, nous permettra de

réaliser les profils métaboliques les plus larges possibles, pour chercher des marqueurs associés à ces statuts physiologiques. Prises dans leur globalité, les empreintes métaboliques révèlent un phénotype qui a valeur de diagnostic : il devient possible de qualifier rapidement des populations d'individus en fonction de leur génotype, de leur nutrition, état de santé, stress, etc. Ces marqueurs peuvent être des métabolites connus (phytomicronutriments notamment) ou bien encore jamais décrits, dont la mise en évidence pourrait permettre de formuler des hypothèses originales quant aux mécanismes métaboliques sous-jacents.

Matériel nécessaire (disponible et/ou à produire), et méthodes envisagées

Deux plantes modèles ont été retenues pour cette étude : la laitue pour laquelle le laboratoire de physiologie des fruits et légumes d'Avignon (UMR Qualisud) a développé une expertise poussée et le fraisier, culture emblématique du Vaucluse.

De manière à avoir l'approche la plus simplifiée, le stress oxydatif sera imposé par une augmentation de l'intensité de l'éclairage ou par des périodes imposées d'ombrage suivies par des périodes de désombrage.

Les études suivantes seront réalisées :

- **caractérisation du fonctionnement de la machinerie photosynthétique** à partir de :
 - l'analyse des **courbes d'induction de la fluorescence maximale de la chlorophylle a**, courbes OJIP et cinétique lente (analyse de la capture de l'énergie lumineuse, du fonctionnement du photosystème II et des transferts d'électrons dans la chaîne de transport photosynthétique).
 - la mesure de l'efficacité quantique du photosystème I (**évaluation du flux cyclique d'électrons** (Dual PAM - Walz)).
 - **mesures conjointes des échanges gazeux et de l'efficacité quantique du photosystème II** (Li6400 - LICOR) – détermination de la photosynthèse nette, la capacité photosynthétique et ses composantes, la photorespiration et les flux d'électrons en direction des puits dits alternatifs en aval du photosystème I (réaction de Mehler) et la respiration mitochondriale ;
Avec ces 3 approches on peut évaluer pratiquement tous les flux d'énergie et d'électrons et toutes les efficacités depuis l'absorption de photons par les antennes collectrices jusqu'aux accepteurs finaux d'électrons.
- **analyse transcriptomique (NGS)** des situations comparées, considérées comme les plus pertinentes. Cette étude permettra une approche globale des processus physiologiques complexes impliquant la régulation des gènes et enzymes des voies métaboliques y compris secondaires, elles-mêmes contrôlées via les cascades de signalisation moléculaires. Une attention particulière sera portée aux enzymes de détoxification des EROs. Cette étude sera complétée par des mesures de l'activité enzymatique des enzymes de détoxification des EROs et du cycle de l'ascorbate/glutathion qui est le principal système antioxydant.;
- **analyse non-ciblée des métabolites** avec les outils de métabolomique en cours d'acquisition grâce au projet CPER/FEDER 3A et au projet régional PROMET. L'optimisation méthodologique s'attachera à couvrir la gamme la plus large possible de composés primaires (GC-MS) et secondaires (LC-MS).

Programme de recherches

Il s'agira dans un premier temps, de déterminer la gamme adéquate de variations de l'intensité lumineuse et de rechercher pour chacune d'entre elles des corrélations entre i) les paramètres déduits des mesures de fluorescence de la chlorophylle a, ii) les concentrations en composés secondaires.

A partir de ce travail, les situations plus pertinentes en terme d'efficacité sur l'amélioration de la qualité, seront choisies pour entreprendre les études en vue de l'étude des voies métaboliques et de signalisation impliquées. Le profil métabolomique et transcriptomique des végétaux, dans ces conditions, sera déterminé à la récolte et au cours de la conservation après récolte.

Calendrier

Année 1

Déterminer des corrélations entre l'intensité du stress lumineux et les teneurs en composés secondaires.

Année 2

Effectuer les analyses de transcriptomique et de métabolomique afin d'analyser les voies métaboliques et de signalisation et les réorientations du métabolisme en réponse au stress photoxydatif.

Année 3

Réaliser les mesures complémentaires éventuellement requises par le travail de thèse. Rédiger les articles scientifiques et formuler des propositions d'itinéraires techniques et de conservation réalistes qui permettent d'agir sur les concentrations en phytomicronutriments et la qualité des produits.

Publications envisageables

Plusieurs publications sont envisageables, *a minima* :

1 publication sur la caractérisation des flux d'énergie et notamment ceux spécifiques du photosystème II en cas de stress photooxydatif ;

1 publication sur les effets du stress oxydatif sur la teneur en composés secondaires à la récolte et les évolutions en post récolte ;

1 ou plusieurs publications sur les modulations par le stress oxydatif des voies métaboliques mises en évidence par les études transcriptomiques et métabolomiques associées.

Compétences cognitives et techniques acquises par le doctorant

L'étudiant acquerra les compétences techniques suivantes :

- mesure des échanges gazeux et des paramètres de fluorescence de la chlorophylle ;
- utilisation des outils de la plate-forme métabolomique ;
- préparation des échantillons en vue des analyses NGS et interprétation des résultats.

Au niveau cognitif, l'étudiant apprendra à construire des protocoles expérimentaux, analyser des résultats, les confronter avec les données bibliographiques et rédiger ses travaux sous forme de rapports et de publications.

Partenariat scientifique et industriel dans lequel s'inscrit le travail

La thèse s'effectuera au sein de l'UMR Qualisud à Avignon. Le sujet proposé recoupe les activités de recherche de plusieurs membres du laboratoire : trois maîtres de conférences et un ingénieur de recherche. L'étudiant retenu bénéficiera donc d'un encadrement très ciblé et pertinent. Par ailleurs, le laboratoire gère de nombreux contrats avec des partenaires industriels, sur l'évolution qualité des produits végétaux après récolte. Ce dernier aspect permettra au candidat retenu de se familiariser également avec des aspects de recherche plus appliquée et de se créer un réseau parmi d'entreprises privées.

Références bibliographiques

- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50:601-639.
- Biswal B., Joshi P., Raval M., Biswal U. (2011) Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signalling and adaptation. Current Science(Bangalore) 101:47-56.
- Christen D., Schönmann S., Jermini M., Strasser R.J., Défago G. (2007) Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. Environmental and Experimental Botany 60:504-514.
- Darwish M., Lopez-Lauri F.I., Vidal V.r., El Maataoui M., Sallanon H. (2015a) Alternation of light/dark period priming enhances clomazone tolerance by increasing the levels of ascorbate and phenolic compounds and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plantlets. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 148:9-20.
- Darwish M., Vidal V.r., Lopez-Lauri F.I., Alnaser O., Junglee S., El Maataoui M., Sallanon H. (2015b) Tolerance to clomazone herbicide is linked to the state of LHC, PQ-pool and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Journal of plant physiology 175:122-130.
- Fanciullino A.L., Bidel L.P.R., Urban L. (2013) Carotenoid responses to environmental stimuli: integrating redox and carbon controls into a fruit model. Plant, Cell & Environment:n/a-n/a.

- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology* 9:436-442.
- Kalaji H.M., Schansker G., Ladle R.J., Goltsev V., Bosa K., Allakhverdiev S.I., Brestic M., Bussotti F., Calatayud A., Dabrowski P. (2014) Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis research* 122:121-158.
- Murchie E., Lawson T. (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*:ert208.
- Noctor G., Lelarge-Trouverie C., Mhamdi A. (2015) The metabolomics of oxidative stress. *Phytochemistry* 112:33-53.
- Poiroux-Gonord F., Bidet L.P.R., Fanciullino A.-L., Gautier H., Lauri-Lopez F., Urban L. (2010) Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:12065-12082.
- Ripoll J., Urban L., Staudt M., Lopez-Lauri F., Bidet L.P., Bertin N. (2014) Water shortage and quality of fleshy fruits, making the most of the unavoidable. *Journal of Experimental Botany*:eru197..
- Steinbrenner J., Linden H. (2003) Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant Molecular Biology* 52:343-356.
- Stirbet A.G. (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and photosystem II: basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 104:236-257.
- Vanderauwera S., Zimmermann P., Rombauts S., Vandenabeele S., Langebartels C., Grisse W., Inzé D., Van Breusegem F. (2005) Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology* 139:806-821.

Autres informations (1/2 page maximum)

--

Avis du directeur d'unité / laboratoire

Avis des directeurs de laboratoires

Ce projet de thèse s'insère dans un vaste programme d'étude des effets des stress environnementaux sur la qualité nutritionnelle et organoleptique et sur l'aptitude à la conservation après récolte des produits végétaux. Une des problématiques récurrente dans l'ensemble de l'UMR est le manque de critères de détermination de la qualité à la récolte, que les produits soient à destination de la consommation en frais ou de la transformation agroalimentaire.

Ce sujet de thèse, en recherchant des marqueurs non destructifs de la qualité est au coeur des problématiques du laboratoire et bénéficie d'un soutien sans réserve de l'ensemble de ses membres.

Huguette Sallanon

UMR Qualisud