THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Agrosystèmes, Écosystèmes et Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme CLAIRE BARBET - MASSIN

le vendredi 3 juillet 2015

Titre :

SELECTIONNER ET CULTIVER STEVIA REBAUDIANA BERTONI EN MILIEU TEMPERE: EXPLORATION DE LA VARIABILITE DE LA TENEUR ET DE LA COMPOSITION EN GLYCOSIDES DE STEVIOL

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Ecole d'Ingénieur Purpan (EI PURPAN)

Directeur(s) de Thèse :

M. JEAN DAYDE

Rapporteurs :

M. JAN GEUNS, KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN

Mme HUGUETTE SALLANON, UNIVERSITE D'AVIGNON

M. PIERRE WAFFO-TEGUO, UNIVERSITE BORDEAUX 2

Membre(s) du jury :

M. PHILIPPE DEBAEKE, INRA TOULOUSE, Président

M. JEAN DAYDE, EI PURPAN, Membre

M. JOEL PERRET, STEVIA NATURA SAS, Membre

M. LIONEL ALLETTO, EI PURPAN, Membre

Mme MONIQUE BERGER, EI PURPAN, Membre

Remerciements

Ce travail a eu lieu dans le cadre du projet STEVIANOV, Fonds Unique Interministériel labellisé par Agri Sud-Ouest Innovation et financé par BPI et la Région Midi-Pyrénées. Ce projet est le fruit d'un partenariat entre l'Epi Salvagnacois (Salvagnac, 81), la société Stevia Natura (Riom, 63), l'entreprise La Patelière (Condom, 32), le laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA) UMR 1010 INRA/INPT-ENSIACET (Toulouse, 31), et les laboratoires d'Agronomie et d'Agrophysiologie de l'INP-EI Purpan (Toulouse, 31).

J'adresse en premier lieu mes remerciements à mes encadrants, Monique Berger, qui m'a guidée au quotidien durant ces trois années et Jean Daydé, présent à chaque étape cruciale de ma thèse. J'ai beaucoup apprécié nos échanges, nourris par la culture scientifique inépuisable et la créativité de Monique et par la vision d'ensemble toujours juste de Jean.

Mes remerciements s'adressent aussi à Lionel Alletto, Enseignant Chercheur en agronomie qui a participé à l'encadrement de cette thèse, et à Simon Giuliano, Ingénieur de recherche en agronomie investi dans le projet STEVIANOV. Travailler avec eux fut un plaisir et leur réactivité, tant sur le terrain que pour les relectures et corrections, fut très appréciable.

Un grand merci à Geoffray Laurens-Lambert, François Perdrieux et John Wey, techniciens de recherche impliqués dans le projet, qui ont participé à sa mise en place et aux expérimentations, de la construction de la serre aux analyses en laboratoire, en passant par (des milliers de) boutures, rempotage, effeuillage. Cette thèse n'aurait pu avoir lieu sans eux.

Je remercie BPI et la Région Midi-Pyrénées, qui ont financé le projet STEVIANOV et ce travail de thèse. Je remercie également l'ensemble des partenaires du projet avec lesquels j'ai interagi durant ces trois années : Rémy Andrieu, gérant de l'Epi Salvagnacois, Charlotte Sohy, chargée biocombustibles et David Puggia, technicien silo et culture ; Joël Perret, président de Stevia Natura et Mathieu Penin, R&D ; Didier Cruvelier, directeur de La Patelière ; Gérard Vilarem et Marion Alignan, ingénieurs de recherche au LCA et Jean-Baptiste Jentzer, doctorant. Un grand merci aussi aux agriculteurs impliqués dans le projet, MM. Beneschi et Laur.

J'adresse ma gratitude aux membres de mon comité de thèse pour leurs conseils avisés et le temps qu'ils m'ont consacré : Jane Hubert, Pierre Maury, Joël Perret. Je remercie

également Jan Geuns, Huguette Sallanon et Pierre Waffo-Teguo, qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Merci aussi à Joël Perret et Philippe Debaeke d'avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Djamila Lekhal et à Frédéric Violleau, directeurs du Département des Sciences Agronomiques et Agro-alimentaires et du laboratoire d'Agro-physiologie Agro-molécules de l'INP-EI Purpan, pour m'avoir intégrée dans leurs équipes. Je remercie ces mêmes équipes et notamment Mireille Gaucher sans qui je n'aurais pu faire toutes les analyses en laboratoire. Je remercie aussi Alban Jacques, pour sa gentillesse et ses conseils avisés lors de la rédaction.

Un grand merci aux stagiaires qui ont participé à ce travail, et s'y sont largement investis : Mathieu Giraud, Jean-Baptiste Hilaire, Dina Banjarnahor, Audrey Castaing, Bastien Fregeat, Gonzalo Garcia, Eduardo Salazar.

Je remercie toute l'équipe de la maintenance de l'EI Purpan, qui a été d'une grande aide à de multiples reprises au cours de ce travail de thèse.

Je remercie également l'ensemble des techniciens de recherche de la station expérimentale de Lamothe et tous les stagiaires qui y ont été durant ces trois années. Le fonctionnement solidaire de cette station expérimentale les a amenés à contribuer au bon déroulement des expérimentations, en particulier lors de la récolte. Merci !

Merci aussi à toute l'équipe des doctorants et associés de Purpan, pour tous ces bons moments passés ensemble : Maria, Jérôme, Sébastien, Jonas, Ana, Romain, Sophie, Marielle, Eugénie, Caroline, Antoine, Emmanuelle, Simon, Hélène et bien sûr Mickaël !

Enfin je remercie tous mes proches pour leur soutien, leurs encouragements et pour leur présence pleine d'humour et de sérénité à mes côtés.

Table des matières

REMERCIEMENTS **1**

TABLE DES MATIERES **3**

LISTE DES ABBRÉVIATIONS **7**

RESUME **11**

ABSTRACT **12**

INTRODUCTION GENERALE **13**

PARTIE 1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PROBLEMATIQUE **17**

CHAPITRE 1 : *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI, LA PLANTE ET SA CULTURE **19**

1. DESCRIPTION GENERALE 21
1.1. Origine et classification *21*
1.2. Description botanique *22*
1.3. Cycle de développement *24*
2. CARACTERISTIQUES AGRONOMIQUES 27
2.1. La plante dans son habitat d'origine *27*
2.2. Conduite de S. rebaudiana en milieu tempéré *27*
2.2.1. Type de sol et intrants 28
2.2.2. Besoins en eau 28
2.2.3. Implantation 29
2.2.4. Adventices et maladies 30
2.2.5. Récolte 32
3. DOMESTICATION DE L'ESPECE 33
3.1. Modes de propagation de l'espèce et sélection variétale *33*
3.1.1. Sélection variétale en vue d'une propagation sexuée 33
3.1.2. Sélection variétale en vue d'une propagation asexuée 35
3.2. Critères de sélection *37*
3.2.1. Teneur et composition en glycosides de stéviol 38
3.2.2. Critères morphologiques 38

CHAPITRE 2 : LES GLYCOSIDES DE STEVIOL **41**

1. CARACTERISTIQUES 43
1.1. Structure chimique *43*
1.2. Caractéristiques organoleptiques *47*
1.3. Extraction et dosage des glycosides de stéviol *48*
2. BIOSYNTHESE DES GLYCOSIDES DE STEVIOL 51
2.1. Distribution des glycosides de stéviol dans la plante *51*
2.2. Voie de biosynthèse des glycosides de stéviol *51*
2.2.1. Voie du MEP 52
2.2.2. Terpènes cyclases 53
2.2.3. Cytochromes p450 56
2.2.4. Glycosyltransferases 56
2.2.5. Localisation de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol 59

2.3. Enzymes-clés pour la régulation de la voie de biosynthèse des SVglys 61
2.3.1. Enzymes communes aux gibbérellines et au stéviol 62
2.3.2. Enzymes spécifiques aux glycosides de stéviol 62
2.3.3. Régulation de la composition en glycosides de stéviol 63
3. ROLE DES GLYCOSIDES DE STEVIOL DANS LA PLANTE 65
3.1. Le stéviol, précurseur de gibbérellines 65
3.2. Une réserve d'énergie 66
3.3. Des osmolytes 67
3.4. Des pièges à espèces réactives de l'oxygène 68
3.5. En défense contre les ravageurs 69
4. VARIABILITE DE LA TENEUR ET DE LA COMPOSITION EN GLYCOSIDES DE STEVIOL DANS LES FEUILLES 71
4.1. Effet du génotype 71
4.2. Facteurs ontogéniques et environnementaux 73
4.2.1. Stade de développement 73
4.2.2. Photopériode et âge de la feuille 74
4.2.3. Intensité lumineuse et source de carbone 75
4.2.4. Température 76
4.2.5. Eau et éléments nutritifs 76

CHAPITRE 3 : OBJECTIFS DE THESE ET MOYENS MIS EN ŒUVRE 79

1. OBJECTIFS DE THESE 81
2. MATERIEL VEGETAL 83
2.1. Origine du matériel végétal 83
2.2. Mode de propagation 83
3. SITES EXPERIMENTAUX 87

PARTIE 2. VARIABILITE GENOTYPIQUE ET INTERACTIONS GENOTYPE-ENVIRONNEMENT 91

INTRODUCTION DE LA PARTIE 2 93

CHAPITRE 4. EFFETS GENOTYPIQUES SUR LA TENEUR ET LA COMPOSITION EN GLYCOSIDES DE STEVIOL ET SUR DIVERS CARACTERES MORPHO-PHYSIOLOGIQUES 97

1. EVALUATION DE LA VARIABILITE GENOTYPIQUE POUR LA TENEUR ET LA COMPOSITION EN GLYCOSIDES DE STEVIOL 99
1.1. Introduction 99
1.2. Materials & Methods 103
1.2.1. Plant material and growth conditions 103
1.2.2. Steviol glycosides content and composition in leaves 104
1.2.3. Statistical analysis 104
1.3. Results 105
1.3.1. Genotypic variability in steviol glycosides content and composition 105
1.3.2. Environmental effects on steviol glycosides content and composition 106
1.4. Discussion 108
2. EVALUATION DE LA VARIABILITE DE CARACTERES MORPHO-PHYSIOLOGIQUES 111
2.1. Introduction 111
2.2. Matériels et méthodes 112
2.2.1. Matériel végétal et conditions de croissance 112
2.2.2. Mesures 112
2.2.3. Traitement des résultats 113
2.3. Résultats et discussion 113
2.3.1. Caractéristiques morphologiques des feuilles 113
2.3.2. Caractéristiques morphologiques et de précocité des plantes 115
2.3.3. Evaluation des génotypes sur l'ensemble des caractères morpho-physiologiques 115
2.4. Conclusion 117

CHAPITRE 5. CARACTERISATION DE CLONES DANS DIFFERENTS CONTEXTES PEDOCLIMATIQUES 119

1. INTRODUCTION 121
2. MATERIELS ET METHODES 123
   2.1. Matériel végétal et conditions de croissance 123
      2.1.1. Matériel végétal 123
      2.1.2. Conditions de culture et prélèvements 124
   2.2. Mesures 125
      2.2.1. Composantes du rendement 125
      2.2.2. Teneur et composition en glycosides de stéviol 125
      2.2.3. Traitement des résultats 126
3. RESULTATS 127
   3.1. Evaluation des génotypes au stade bouton floral 127
      3.1.1. Symptômes foliaires de maladies 127
      3.1.2. Evaluation du rendement 128
   3.2. Cinétique d'accumulation des glycosides de stéviol et élaboration de la biomasse 129
      3.2.1. Elaboration de la biomasse 129
      3.2.2. Accumulation en glycosides de stéviol 130
      3.2.3. Rendement en glycosides de stéviol aux différents stades de prélèvement 132
4. DISCUSSION 133

CONCLUSION DE LA PARTIE 2 137

PARTIE 3. CONDUITE AGRONOMIQUE ET ANALYSE ECOPHYSIOLOGIQUE 139

INTRODUCTION DE LA PARTIE 3 141

CHAPITRE 6. CINETIQUE D'ACCUMULATION DES GLYCOSIDES DE STEVIOL SELON LE STADE DE DEVELOPPEMENT, L'AGE DE LA FEUILLE ET LA LONGUEUR DE JOUR 143

1. INTRODUCTION 145
2. MATERIELS ET METHODES 147
   2.1. Matériel végétal 147
   2.2. Conditions de croissance 147
   2.3. Prélèvements et mode d'échantillonnage 148
      2.3.1. Essai 1 148
      2.3.2. Essai 2 149
   2.4. Mesures 149
      2.4.1. Elaboration de la biomasse 149
      2.4.2. Teneur et composition en glycosides de stéviol 150
   2.5. Traitement des résultats 150
3. RESULTATS 151
   3.1. Accumulation en glycosides de stéviol 151
      3.1.1. Teneur totale en glycosides de stéviol 151
      3.1.2. Composition en glycosides de stéviol 153
   3.2. Elaboration de la biomasse et rendement en glycosides de stéviol 155
      3.2.1. Elaboration de la biomasse 155
      3.2.2. Rendement en glycosides de stéviol 157
4. DISCUSSION 159

CHAPITRE 7. EFFET DE LA FERTILISATION SUR L'ELABORATION DE LA BIOMASSE, LA TENEUR ET LA COMPOSITION EN GLYCOSIDES DE STEVIOL 163

1. INTRODUCTION 165
2. MATERIALS AND METHODS 169
   2.1. Plant material 169

2.2. Experiments and growth conditions ... 169
2.2.1. Controlled and semicontrolled conditions ... 169
2.2.2. Field conditions ... 170
2.3. Sampling and harvest analysis ... 171
2.4. Nitrogen content in leaves ... 171
2.5. Steviol glycoside content and composition in leaves ... 172
2.6. Leaf gas-exchange measurements ... 172
2.7. Statistical analysis ... 173
3. RESULTS ... 175
3.1. Nitrogen content in leaves ... 175
3.2. Yield components ... 176
3.2.1. Biomass production ... 176
3.2.2. Steviol glycosides content ... 178
3.2.3. Steviol glycoside production per plant ... 178
3.3. Plant physiology and photosynthetic capacity ... 178
3.3.1. Light response curves ... 178
3.3.2. Relationship between specific leaf nitrogen and maximal rate of CO_2 assimilation ... 179
3.4. Steviol glycosides composition ... 181
4. DISCUSSION ... 183

CONCLUSION DE LA PARTIE 3 ... 186

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES ... 188

LISTE DES FIGURES ... 196

LISTE DES TABLEAUX ... 198

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 200

ANNEXES ... 216

Liste des abbréviations

ACN: acétonitrile

Amax: *maximum net rate of CO_2 assimilation*

B: bore

BF: bouton floral

Ca: calcium

CBSC: *carbon-based secondary compounds*

CC: *controlled conditions*

CDP: copalyl diphosphate

CMK: 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl- D-érythritol kinase

CMS: 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl- D-érythritol synthase

CNB: *carbon-nutrient balance*

Co: cobalt

Cu: cuivre

CO_2: dioxide de carbone

CPC: chromatographie de partage centrifuge

CPS: copalyl diphosphate synthase

CYP450: cytochrome P450

C/N: ratio carbone/azote

DA: dulcoside A

DHS: distinction-homogénéité-stabilité

DM: *dry matter*

DMAPP: diméthylallyl diphosphate

DXP:

DXR: déoxyxylulose-5-phosphate réductoisomérase

DXS: déoxyxylulose-5-phosphate synthase

ETP: évapotranspiration potentielle

F: floraison

FC: *field conditions*

Fe: fer

Fru: fructose

G: génotype

GA: *gibberellic acid*

GC: *growth conditions*

GGDP: géranylgéranyl diphosphate

GGDPS: géranylgéranyl diphosphate synthase

Glc: glucose

GPP: géranyl diphosphate

GRAS: *generally recognized as safe*

G_3P: glycéraldéhyde 3-phosphate

HDR: 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-buténYl 4-diphosphate réductase

HDS: 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-buténYl 4-diphosphate synthase

HI: *harvest index*

HILIC: *Hydrophilic Liquid Interaction Chromatographic*

HMBPP: 4-hydroxy-3-méthylbut-2-énYl diphosphate

HPLC: chromatographie en phase liquide à haute performance

HPS: *high-pressure sodium*

I: *photosynthetic photon flux density*

IDI: isopenténYl diphosphate isomérase

IGE : interactions génotype - environnement

I_k: *light-saturation point*

IPP: isopenténYl diphosphate

K: potassium

KAH: kaurénoic acid hydroxylase

KAO: kaurénoic acid oxygénase

KO: kaurène oxidase

KS: kaurène synthase

LD: *long days*

LMA: *leaf mass per unit leaf area*

LMR: *leaf mass ratio*

LS: *location site*

LSD: *least significant difference*

MCS: 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl- D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase

MDWSR: *midday water stress response*

MEP: 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate

Mg: magnésium

MH: *metal-halide*

Mn: manganèse

Mo: molybdène

MO: matière organique

MS: matière sèche

N: azote

NO_3^-: nitrate

P: phosphore

PA: *plant age*

PAR: *photosynthetically active radiation*

PCA: *principal component analysis*

P_N: *net photosynthesis rate*

PPFD: *photosynthetic photon flux density*

PSPG: *plant secondary product glycosyltransferase*

PY: *planting year*

RA : rébaudioside A

RA/ST: ratio rébaudioside A / stévioside

RB: rébaudioside B

RC: rébaudioside C

RCBD: *randomized completely block design*

R_d: *dark respiration*

RF: rébaudioside F

RH: *relative humidity*

Rhm: rhamnose

RMN: résonnance magnétique nucléaire

ROS: *reactive oxygen specie*

SCC: *semicontrolled conditions*

SD: *short days*

SEM: erreur standard de la moyenne

SLW: *specific leaf weight*

SPE: *solid phase extraction*

SPIR: spectroscopie proche infra-rouge

ST: stévioside

SV: stéviol

SVB : stéviolbioside

SVgly: glycoside de stéviol

T: température

UGT: UDP-dependant glycosyltransférase

V: végétatif

WUE: *water use efficiency*

Xyl: xylose

Zn: sinc

Ψ_{MID}: *midday water potential*

Φ_{I0}: *apparent quantum yield of photosynthesis*

Résumé

Sélectionner et cultiver *Stevia rebaudiana* Bertoni en milieu tempéré : exploration de la variabilité de la teneur et de la composition en glycosides de stéviol

Stevia rebaudiana Bertoni, une herbe vivace de la famille des *Asteraceae* originaire du Paraguay, est d'un intérêt croissant en tant que source d'édulcorants naturels acoloriques, les glycosides de stéviol (SVglys). Ces diterpénoïdes sont organisés autour d'un noyau de stéviol et diffèrent par le nombre et la nature d'unités de sucre liées à ce noyau. Ils sont accumulés à des concentrations allant de 4 à 20% de la masse sèche des feuilles, selon le génotype, le stade phénologique et les conditions de croissance. *S. rebaudiana* apparaît comme une espèce alternative prometteuse en Europe, mais nécessite au préalable une évaluation de ses besoins en culture et un travail de sélection variétale afin d'optimiser la teneur et la composition en SVglys en milieu tempéré. L'objectif de ce travail était d'étudier les sources de variabilité génotypique et environnementale pour l'accumulation en SVglys et la production de biomasse foliaire. Une forte variabilité génotypique a été observée pour la composition en SVglys et, à un degré moindre, pour la teneur en SVglys ainsi que pour des critères morphologiques et de précocité. L'environnement (fertilisation, durée du jour, stade phénologique, âge de la plante) a également eu un effet sur l'élaboration de la biomasse foliaire et sur la teneur en SVglys, alors que la composition en SVglys a été moins affectée par ces facteurs. Ces résultats suggèrent des mécanismes biochimiques et génétiques complexes régissant la voie de biosynthèse des SVglys. Ils laissent également entrevoir des possibilités de sélection variétale et donnent des indications sur les exigences de *S. rebaudiana* pour sa culture sous nos climats.

Mots-clés

Stevia rebaudiana ; Glycosides de stéviol ; Accumulation en métabolites secondaires ; Déterminisme génotypique ; Interactions Génotype-Environnement

Abstract

Breeding and cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in temperate areas: exploration of steviol glycoside content and composition variability

Stevia rebaudiana Bertoni, a perennial shrub of the *Asteraceae* family originating from Paraguay, is of increasing interest as a source of zero-calorie natural sweeteners: the steviol glycosides (SVglys). These diterpenoids differ in the number and the nature of sugar units bound to a steviol skeleton. They accumulate in leaves at concentrations ranging from 4 to 20%, according to genotype, phenological stage, and growth conditions. *S. rebaudiana* appears as a promising alternative culture in Europe, but requires investigations to assess its cultivation plant requirements and a breeding effort to optimize SVgly content and composition under temperate climate. The objective of this work was to explore the sources of genotypic and environmental variability for SVglys accumulation and leaf biomass production. High genotypic variability has been observed for SVgly composition and, to a lesser extent, for SVgly content as well as for morphological criteria and precocity. Leaf biomass and SVgly content varied also with the environment (fertilization, daylength, phenological stage) and over the years in perennial culture, while SVgly composition was less affected by these factors. These results suggested complex biochemical and genetic mechanisms regulating SVglys biosynthetic pathway. In parallel they revealed breeding potentialities and gave indications on *S. rebaudiana* requirements for its cultivation under temperate climate.

Keywords

Stevia rebaudiana; Steviol glycoside; Secondary metabolites accumulation; Genotypic determinism; Genotype-environment interaction

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis les années 1980, les problèmes d'obésité et de diabète de type II ont été multipliés par 2 ou 3 (Capewell et Buchan, 2012). Ils ont atteint des proportions telles que l'on parle d'épidémie mondiale (OMS, 2010). On observe en parallèle un engouement pour les aliments hypocaloriques, light ou sans sucre. En réponse à cette demande, de nouvelles alternatives au sucre sont apparues ces dernières années, telles que les édulcorants intenses. Alors que le marché du sucre montre une croissance de 3-4% par an, la demande pour des agents sucrants alternatifs augmente de 8% par an. Si les édulcorants de synthèse ont été largement consommés ces 20 dernières années, des expériences ont mis en doute leur absence de nocivité pour la santé (Marti *et al.*, 2008). Bien que de récentes évaluations aient montré que l'aspartame ne présentait pas de danger pour la santé (EFSA, 2013), la révélation d'un risque potentiel des édulcorants de synthèse a entraîné l'apparition d'un nouveau marché, celui des édulcorants intenses d'origine naturelle.

Stevia rebaudiana Bertoni est une herbe sauvage apparue aux confins de la forêt subtropicale du nord-est du Paraguay (Shock, 1982), ayant des feuilles au goût sucré. De nombreux glycosides de stéviol sont en effet accumulés dans la plante. Ils sont estimés comme ayant un pouvoir sucrant 200 à 300 fois supérieur à celui du saccharose, et sont acaloriques (Matsui *et al.*, 1996). Ils apparaissent ainsi comme candidats potentiels pour venir en substitution aux édulcorants de synthèse. Au sein de l'Union Européenne, la consommation de *S. rebaudiana* a été interdite jusqu'à récemment, faute de preuves scientifiques de son absence de risques pour la santé. Le 11 novembre 2011, le texte pour l'utilisation de *S. rebaudiana* comme additif alimentaire a été voté par la Commission Européenne (UE, 2011).

L'utilisation de *S. rebaudiana* s'est développée au Japon dès la fin des années 1970 (Lewis, 1992). En 2007, elle représentait 40% du marché des édulcorants intenses dans ce pays (consommation annuelle estimée à 200 t.) (Rajasekaran *et al.*, 2007). Au cours des décennies suivantes, la culture de *S. rebaudiana* s'est développée dans de nombreux pays : le Paraguay, le Brésil, l'Uruguay et l'Amérique Centrale. La Chine, la Thaïlande, l'Inde et Israël ont également lancé des cultures commerciales. Les surfaces de culture de *S. rebaudiana* se sont multipliées ces dernières années : elles sont estimées à 20-25 000 ha en 2008 et 67-80 000 ha en 2011 (Kienle, 2010). D'autres pays sont en expérimentation pour des cultures

commerciales : c'est le cas notamment du Canada, de la Nouvelle Zélande, de l'Australie et, en Europe, de la Belgique, de l'Allemagne, de l'Angleterre, de la France, de l'Italie et de la Grèce. Il n'existe néanmoins pas à ce jour de système de culture mécanisé de *S. rebaudiana*.

C'est dans ce contexte qu'en 2011, le FUI STEVIANOV, labellisé et financé par le pôle de compétitivité Agri Sud-Ouest Innovation, a vu le jour. L'ambition de ce projet est de développer une filière agro-industrielle française de *S. rebaudiana*. Il réunit pour cela cinq partenaires qui représentent l'ensemble de la filière : (1) l'Epi Salvagnacois, acteur agricole majeur dans le Tarn (81) ; (2) la société Stevia Natura, ancrée dans le Puy-de-Dôme (63) et spécialisée dans la production et la commercialisation des produits issus de *S. rebaudiana* ; (3) l'entreprise La Patelière, basée dans le Gers (32), spécialisée dans la fabrication, le conditionnement et la distribution de produits d'aide à la pâtisserie conventionnelle et biologique et des confiseries ; (4) le laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA) UMR 1010 INRA/INPT-ENSIACET, dont l'objectif principal est la valorisation des produits et sous-produits de l'agriculture, de la forêt et des agro-industries ; (5) les laboratoires d'Agronomie et d'Agrophysiologie de l'INP-EI Purpan, dont les compétences portent d'une part sur la conception et l'évaluation de systèmes de culture économes en intrants, et d'autre part sur les voies métaboliques d'espèces cultivées (soja, tournesol) et l'accumulation en métabolites secondaires d'intérêt, ainsi que sur des travaux de sélection variétale.

L'objectif, à l'issue de ce projet, est de pouvoir proposer des génotypes de *S. rebaudiana* en vue d'un travail de sélection variétale, des itinéraires techniques appropriés, des surfaces de culture adaptées aux besoins du marché, une unité de première transformation et de purification des différents produits issus de l'extraction des productions végétales et un circuit de commercialisation de ces différents produits. L'ancrage régional de STEVIANOV pour l'amont de la filière (production agricole) s'explique par le fait que la production de *S. rebaudiana* serait, pour les agriculteurs locaux, une alternative à la production de tabac, en remobilisant la plupart du matériel spécifique à cette culture.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail de recherche, réalisé au sein des laboratoires d'Agronomie et d'Agrophysiologie de l'INP-EI Purpan, est d'explorer les sources de variabilité génotypique et environnementale pour l'élaboration de la biomasse foliaire et l'accumulation en glycosides de stéviol, en vue d'une culture de *S. rebaudiana* en milieu tempéré. Afin de mieux cerner les enjeux scientifiques de cette problématique, une revue bibliographique (Partie 1, chapitres 1 et 2) recense l'ensemble des études agronomiques,

physiologiques, biochimiques et génétiques déjà menées sur *S. rebaudiana*, et conduit à la formulation des objectifs spécifiques à ce travail de recherche et des moyens mis en œuvre (Partie 1, chapitre 3). Les résultats obtenus sont organisés en deux parties, divisées en chapitres. Les chapitres 4 et 5, qui constituent la Partie 2, explorent la variabilité génotypique de la teneur et de la composition en glycosides de stéviol, ainsi que de critères morphologiques et de précocité. Ces chapitres s'intéressent également aux interactions génotype x environnement. Enfin, les chapitres 6 et 7, regroupés dans la troisième partie, proposent une approche écophysiologique pour évaluer l'effet de facteurs environnementaux sur l'élaboration de la biomasse et l'accumulation en glycosides de stéviol chez *S. rebaudiana*. Les facteurs étudiés sont le stade de développement de la plante, l'âge de la feuille, la longueur du jour et la fertilisation.

PARTIE 1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PROBLEMATIQUE

Chapitre 1 : *Stevia rebaudiana* Bertoni, la plante et sa culture

1. DESCRIPTION GENERALE

1.1. Origine et classification

Stevia rebaudiana Bertoni est une plante originaire du Nord-Est du Paraguay (Shock, 1982), appartenant à la famille des *Asteraceae*, sous-famille *Asteroideae*, tribu *Heliantheae*, genre *Stevia*. Le genre *Stevia* comprend environ 240 espèces, distribuées du Sud-Ouest des Etats-Unis au Nord de l'Argentine (Robinson et King, 1977 ; Soejarto, 2002). Les plantes appartenant au genre *Stevia* sont des herbes ou des arbrisseaux annuels ou pluriannuels, principalement trouvés entre 500 et 3000 mètres au-dessus du niveau de la mer, généralement dans des environnements montagneux semi-secs (Soejarto *et al.*, 1983).

S. rebaudiana est l'espèce la mieux connue du genre *Stevia*. C'est une plante au goût sucré, dû à la présence de composés au fort pouvoir sucrant dans ses feuilles, les glycosides de stéviol (SVglys). Selon l'étude de Kinghorn *et al.* (1984), une autre espèce, *Stevia phlebophylla*, originaire du Mexique, contient des traces de stévioside, le plus commun des SVglys, qui confèrent à la plante un goût sucré. Par ailleurs, un SVgly, le rubusoside, a été identifié dans une espèce de la famille des rosacées : *Rubus chingi var suavissmus* (S.K. Lee) (Tanaka *et al.*, 1981 ; Ohtani *et al.*, 1992).

Les propriétés sucrantes de *S. rebaudiana* sont connues depuis longtemps par les Guaranis, Indiens des montagnes du Paraguay, qui appellent cette plante *caá-êhê*, qui signifie « herbe sucrée » (Lewis, 1992). Cette plante a été révélée au reste du monde par le botaniste suisse-italien M.S. Bertoni en 1887 (Lewis, 1992). Dès 1900, le chimiste paraguayen O. Rebaudi mentionna la présence d'un composé sucrant dans la plante, comparable à l'acide glycyrrhizique (principe actif de la réglisse). Mais ce n'est qu'en 1931 que les chimistes français M. Bridel et R. Lavieille isolèrent le stévioside (Robinson, 1930 ; Bridel et Lavieille, 1931). Le stévioside fut considéré comme l'unique SVgly présent dans les feuilles de *S. rebaudiana* jusqu'à l'isolement par des équipes japonaises de nouveaux SVglys à la fin des années 1970, tels que le rébaudioside A (Kohda *et al.*, 1976), le rébaudioside C (Sakamoto *et al.*, 1977a), les rébaudiosides D et E (Sakamoto *et al.*, 1977b), le dulcoside A (Kobayashi *et al.*, 1977). A l'heure actuelle plus de 30 SVglys ont été identifiés, dont certains sont cependant peut-être des artefacts formés au cours de l'extraction et/ou de l'isolement (Morlock *et al.*, 2014). Les deux SVglys majeurs sont le stévioside (ST) et le rébaudioside A

(RA). Les caractéristiques organoleptiques de ce dernier sont plus appréciées que celles du ST (cf. chapitre 2, *§ 1.2*).

Les premières exportations de *S. rebaudiana* eurent lieu pendant la Seconde Guerre Mondiale en direction du Royaume-Uni, pour venir en alternative au sucre dont les approvisionnements s'épuisaient. Sa culture ne s'est cependant pas développée, car la technologie nécessaire pour en faire une culture industrielle n'existait alors pas (Lewis, 1992). La plante a à nouveau été exportée en 1968 vers le Japon, où son exploitation commerciale s'est développée (Lewis, 1992) grâce à la recherche de procédés d'extraction et de raffinage des SVglys (Rajasekaran *et al.*, 2007). Au cours des décennies suivantes, *S. rebaudiana* a été introduite dans de nombreux pays. Aux États-Unis, la Food and Drugs Administration a accordé en 2008 le statut GRAS (Generally Recognized As Safe), en tant qu'additif alimentaire, au RA (US Food and Drug Administration, 2009). En France, le RA (purifié à 97%) a été autorisé pour le même usage en 2009 (AFSSA, 2009). Par la suite, en 2011, l'Union Européenne a autorisé sous le code E960 l'ensemble des glycosides de stéviol purifiés à 95% selon les termes de la réglementation (CE) n°1333/2008 relative aux additifs alimentaires (UE, 2011).

1.2. Description botanique

S. rebaudiana est une plante pérenne. Dans son habitat naturel, c'est une plante mince, avec peu de ramifications. Ses tiges sont ligneuses, recouvertes de fins poils laiteux. En culture, la plante produit de nombreuses ramifications, qui lui donnent l'air d'un arbrisseau dense (Soejarto, 2002) (Figure 1). Les tiges arrivées à maturité dépérissent, et de nouvelles tiges se renouvellent chaque année (Soejarto, 2002). Les feuilles sont de petite taille, allongées, droites et dentées (Dwivedi, 1999) (Figure 1). Elles sont simples, opposées, sub-sessiles, séparées par des entre-nœuds de 2 à 4 cm. Leur forme et leur taille sont variables (Soejarto, 2002).

Le système racinaire de *S. rebaudiana* est pivotant au début de son développement puis devient de plus en plus fasciculé, avec une distribution majeure des racines dans la couche supérieure du sol (Carneiro, 1990). *S. rebaudiana* produisant facilement des repousses et des racines à partir de sa base, il pourrait s'agir d'une plante chaméphyte.

S. rebaudiana est décrite comme auto-incompatible (Yadav *et al.*, 2014). La majorité des espèces de la famille des *Asteraceae* sont auto-incompatibles de type sporophytique (Ferrer et Good-Avila, 2007). Ce système d'incompatibilité fait appel à des gènes d'auto-incompatibilité (S), empêchant la reproduction entre individus partageant un ou plusieurs allèles au locus du gène S (S1, S2, S3…Sx). Dans ce cas, le développement du tube pollinique est bloqué et la fécondation n'a pas lieu. L'auto-incompatibilité observée chez *S. rebaudiana* pourrait être donc de type sporophytique. Les fleurs sont hermaphrodites, petites et généralement blanches (Figure 1). Elles sont regroupées en corymbes comprenant 2 à 6 fleurs, organisés en panicules (Dwivedi, 1999 ; Goettemoeller et Ching, 1999). La pollinisation de *S. rebaudiana* est entomophile (Goettemoeller et Ching, 1999). Les graines sont contenues dans des achènes de 3 mm de long environ surmontées d'un pappus d'une vingtaine de soies (Robinson, 1930 ; Goettemoeller et Ching, 1999). Les akènes fertiles sont de couleur foncée, alors que les non-fécondés sont clairs (Goettemoeller et Ching, 1999) (Figure 1).

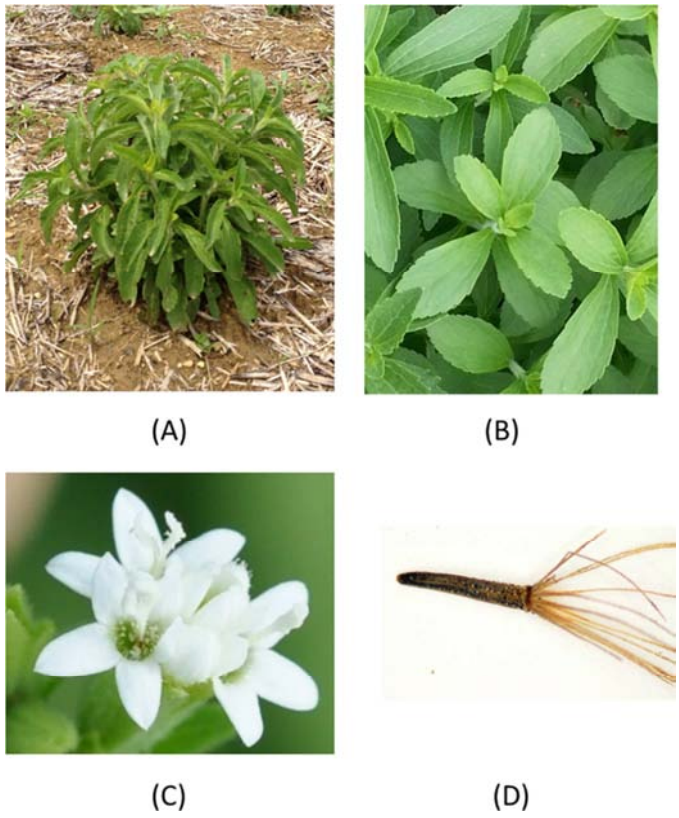


Figure 1: (A) Pied en reprise de végétation à la sortie de l'hiver ; (B) Feuilles ; (C) Fleurs ; (D) Akène fertile de *S. rebaudiana*.

1.3. Cycle de développement

S. rebaudiana est une plante de jours courts, avec une photopériode critique allant de 8 à 14 h selon le génotype, de 13 h en moyenne (Brandle *et al.*, 1998). L'induction de la floraison est initiée par les jours courts. Elle peut avoir lieu dès le stade 4 feuilles. Les jours longs, quant à eux, favorisent le développement végétatif et ainsi l'élaboration de la biomasse (Brandle *et al.*, 1998). L'initiation de la floraison n'est pas uniforme au sein d'une même plante (Carneiro, 1990). Ainsi, tous les stades de développement peuvent être présents sur une même plante au même moment. Une première description des stades de développement de la plante a été réalisée, sur la base de 5 stades végétatifs et 5 stades reproductifs (Tableau 1 et Figure 2) (Carneiro, 2007).

Tableau 1: Description des stades de développement de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Carneiro, 2007).

Table 1. The description of plant development stages for *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni

	V – vegetative stages
V_0	Begining at seed imbibition they end at flower bud appearance. The text has more details *Seed germination:* Debearded seed is absorbing water from the growing medium or germination paper. At most, only the radicle or cotyledons are visible
$V_{1.i}$ for i = 0 ... 10	*Normal seedling*: After seed germination, the seedling hypocotyl is visible, and the unfolded cotyledons are green, upright or parallel to the surface of the growing medium. The *i*-tenth indicates the percentage of normal seedlings whose radicles have already penetrated into the growing medium or are developing on the germination paper
$V_{2.i}$ for i = 1 ... 5	*Seedling growth*: Each seedling node with a pair of true leaves at least 5 mm in length is counted
$V_{3.i.k}$ for i = 1 ... n k = 1 ... m	*Plant growth and branching*: Each plant has just one main stem. The *i*-nodes on the main stem are counted. The *k*-node is the first axillary branch, counting up from the ground, containing at least two internodes at least 2 cm in length
$V_{4.i.k}$ for i = 0 ... n k = 0 ... m	*Plant regrowth*: The *i*-nodes in each stem are counted, and the *k*-node is the uppermost axillary branch which has at least two internodes at least 2 cm in length have already developed
	R – Reproductive stages Starting at differentiation of the branch apex into flower buds, they end with the total wind dispersion of the fruits. The capitula are considered in these descriptions. See the text for more sub-stage details
$R_{1.i}$ for i = 0 ... 10	*Flower buds*: The branch apex has already differentiated into flower buds
$R_{2.i}$ for i = 0 ... 10	*Crop flowering*: The flowers attached on the torus are in anthesis, the time of flowering to pollination
$R_{3.i}$ for i = 0 ... 10	*Developing seeds*: The fruits are growing and individual seeds have different stages of maturation. At the end, the petals are wilted and brownish in color
$R_{4.i}$ for i = 0 ... 10	*Fruit dispersion*: Fruits with a feathery pappus have developed and are ready for wind dispersion. The developed seed embryos in these fruits have reached the physiological maturity
$R_{5.i}$ for i = 0 ... 10	*Senescent plants*: The seeds were dispersed by wind and the torus, totally empty of fruits, are dry and brownish in color

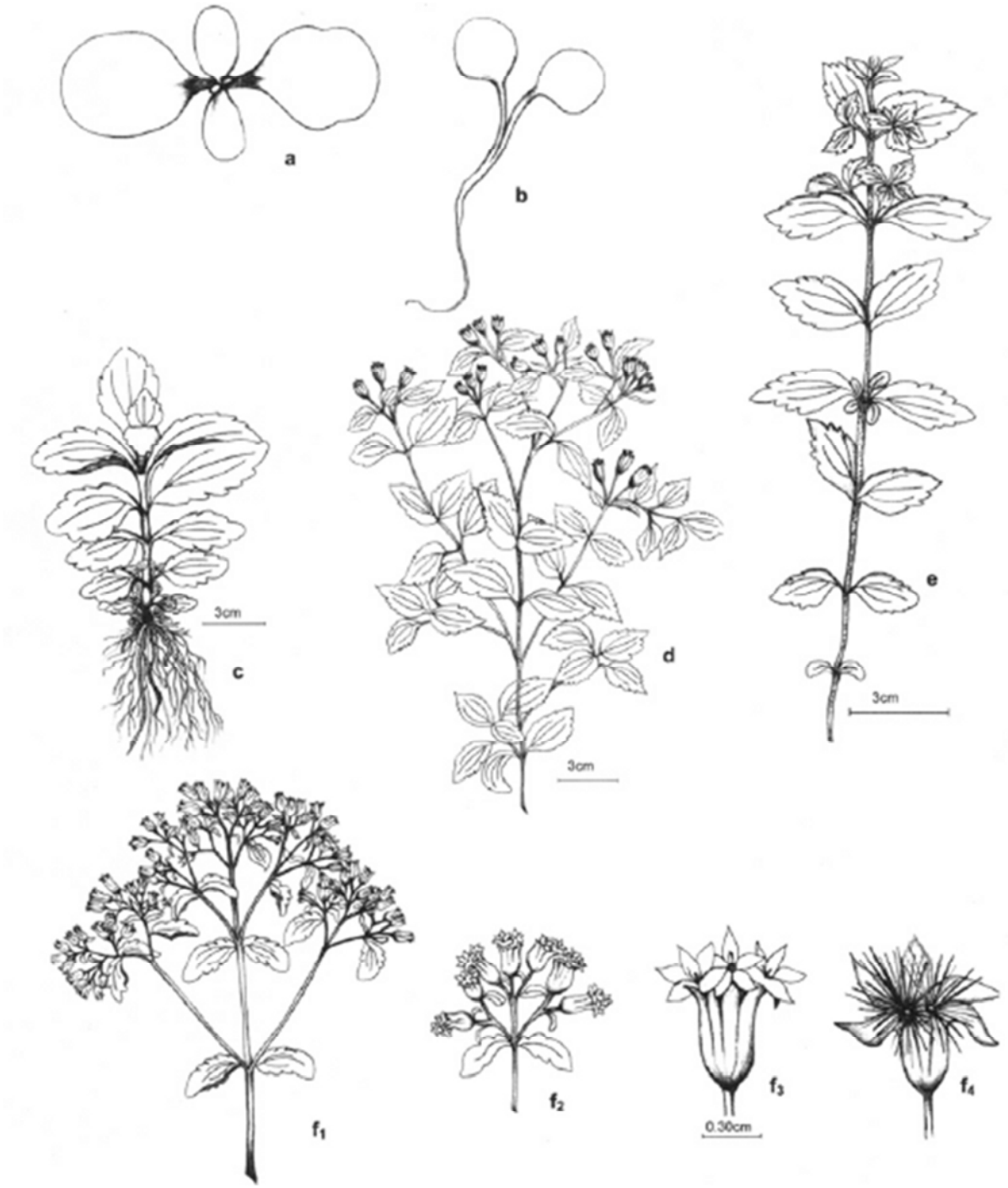


Figure 2 : Structure morphologique des plantes utilisées pour la description des stades de développement: (a) semis en cours de développement ; (b) semis normal lors d'un test de germination ; (c) semis développé avec système racinaire ; (d) plante développée conduite en jours courts ; (e) repousse de tige après taille de la plante ; (f_1) panicule de corymbes avec divers capitules ; (f_2) cyme détachée au hasard pour compter les stades reproductifs ; (f_3) capitule contenant cinq fleurs blanches ; (f_4) capitule contenant des graines prêtes à être dispersées (Carneiro, 2007).

2. CARACTERISTIQUES AGRONOMIQUES

2.1. La plante dans son habitat d'origine

Dans son habitat naturel, on retrouve *S. rebaudiana* sur les bords de marais ou dans des communautés de prairies, dans des sols aux nappes phréatiques peu profondes, continuellement humides mais n'étant pas sujet à une inondation prolongée. Il s'agit en général de sols peu fertiles - tourbes ou sables - et acides (pH ± 4,5). Le climat est subtropical, avec des températures allant de -6°C à +43°C, pour une valeur moyenne annuelle de +23°C, et avec des précipitations moyennes annuelles de 1400 mm (Shock, 1982).

A cette latitude (21-22°S), la photopériode n'excède pas 14 h et est inférieure à 13 h de mars à octobre. Les plantes fleurissent à partir de janvier-mars, ce qui équivaut à juillet-septembre dans l'hémisphère nord. Les plantes arrivées à maturité dépérissent, et leurs repousses entrent en floraison rapidement. Les floraisons se succèdent ainsi jusqu'à l'hiver en juillet. A l'état sauvage, *S. rebaudiana* se reproduit de manière sexuée ou asexuée, grâce à l'enracinement de tiges piétinées par le bétail. La production de graines viables est erratique et la plupart des plantes sont généralement des survivantes des années précédentes. Dans son environnement naturel, *S. rebaudiana* est en compétition avec d'autres adventices, de petite taille et adaptées aux sols peu fertiles (Shock, 1982).

2.2. Conduite de *S. rebaudiana* en milieu tempéré

S. rebaudiana étant une plante de jours courts, dans son habitat d'origine, les floraisons se succèdent rapidement. Les jours longs favorisent quant à eux le rendement foliaire et l'accumulation des SVglys (Metivier et Viana, 1979). La culture de *S. rebaudiana* en milieu tempéré, avec des jours longs en été, permettrait donc d'atteindre une production en SVglys plus élevée. Les connaissances agronomiques pour la conduite de *S. rebaudiana* en milieu tempéré sont encore floues à l'heure actuelle. Néanmoins, grâce aux informations existantes à ce jour et à la connaissance de son milieu naturel, certains des besoins de la plante peuvent être appréhendés.

2.2.1. Type de sol et intrants

S. rebaudiana présente une faible tolérance aux sols salins. Bien qu'elle soit présente naturellement dans des sols acides, cette plante se développe bien sur des sols aux pH compris entre 6,5 et 7,5 (Shock, 1982). La plupart des terres agricoles est plus fertile que les terres de son habitat naturel. Les besoins nutritifs de *S. rebaudiana* en engrais sont donc modérés (Shock, 1982). La production de 1 t/ha de feuilles sèches nécessiterait environ 65 kg d'azote (N), 8 kg de phosphore (P) et 56 kg de potassium (K) (Lima Filho *et al.*, 1997a), ainsi que 89 g de bore, 26 g de cuivre, 638 g de fer, 207 g de manganèse et 13g de zinc (Lima Filho *et al.*, 1997b). Néanmoins, la littérature met en évidence une réponse, en général positive, du rendement aux apports de fertilisants (en particulier de l'azote), avec par exemple des rendements voisins de 3,5 t/ha pour des apports en NPK voisins de 100-30-45 U respectivement contre seulement 1,9 à 2,3 t/ha pour des apports de 60 à 75 U en N, 30 U en P et 45 U en K (Maheshwar, 2005). Les meilleurs résultats d'une autre étude (2,1 t/ha) ont également été obtenus avec l'apport de fertilisation le plus élevé : 275-112-172 U de NPK additionnées à 20 t/ha de fumier (Nevase *et al.*, 2009).

L'étude de Lima Filho et Malavolta (1997) décrit les symptômes de déficience en azote (N), phosphore (P), potassium (K), calcium (Ca), magnésium (Mg) et bore (B), ainsi que les symptômes de toxicité du bore et du zinc (Zn) chez *S. rebaudiana*. Une déficience en azote provoque un développement réduit de la plante, des petites feuilles et un jaunissement généralisé. Une déficience en phosphore entraine une croissance réduite. Les symptômes associés à une déficience en potassium sont un recourbement des feuilles, similaire à un flétrissement, et un jaunissement puis une nécrose des feuilles les plus âgées.

2.2.2. Besoins en eau

Selon Shock (1982), *S. rebaudiana* présente une faible tolérance au stress hydrique et nécessite une irrigation fréquente. Sur l'ensemble du cycle de culture, un apport couvrant 100% de la consommation en eau de la culture a permis d'obtenir une biomasse totale jusqu'à 40% supérieure par rapport à des apports d'eau couvrant 66% ou 33% des besoins de la culture. Néanmoins ce fut au détriment de l'efficience d'utilisation de l'eau par la plante (WUE, Water Use Efficiency) et de l'indice de récolte (HI, Harvest Index ; proportion de la biomasse totale allouée à la biomasse foliaire) (Lavini *et al.*, 2008). De même, une irrigation

couvrant 117% de l'évapotranspiration potentielle (ETP) a permis d'obtenir un rendement en feuilles de 13% supérieur à celui obtenu avec une irrigation couvrant 100% de l'ETP, mais toujours au détriment de la WUE et du HI (Fronza et Folegatti, 2002). Ainsi, à condition que les rendements restent suffisamment élevés, il pourrait être intéressant d'augmenter l'indice de récolte par une diminution de l'irrigation (Lavini *et al.*, 2008). Il ne faut néanmoins pas négliger certains stades de la culture. Une irrigation est nécessaire immédiatement après la transplantation au champ. L'eau doit être apportée de manière constante jusqu'à ce que les jeunes plants aient passé la phase critique de transplantation et qu'ils aient repris une croissance normale (Andolfi *et al.*, 2002).

2.2.3. Implantation

Les plantes sont semées ou bouturées en serre, avant d'être transplantées en champ (Brandle *et al.*, 1998). Au Canada (South Western Ontario), les plantes sont transplantées en champ à partir de la deuxième quinzaine de mai. Elles sont lentes à s'établir jusqu'à la mi-juillet (Brandle *et al.*, 1998). En Italie, la période idéale pour la transplantation des plantes au champ est le mois d'avril, compte-tenu des températures douces et des pluies fréquentes (Andolfi *et al.*, 2002).

La densité de plantation est un paramètre essentiel pour la culture de *S. rebaudiana* qui affecte directement le degré de ramifications primaires et secondaires ainsi que le rendement en feuilles et en tiges de la plante. Le nombre de feuilles et la hauteur des plantes sont néanmoins moins affectés par la densité de plantation (Shu et Wang, 1988). Ce sont donc le diamètre de la tige et l'index de surface foliaire qui varient en fonction de la densité, avec un impact direct sur le rendement de la culture. De nombreux auteurs ont étudié la densité de plantation et l'écartement optimal pour l'obtention d'un rendement en poids sec de feuilles et une teneur en SVglys élevés (Shu et Wang, 1988 ; Carneiro *et al.*, 1992 ; Espitia *et al.*, 2009 ; Singh *et al.*, 2011 ; Vasanthi *et al.*, 2011). La première année, les plantes sont moins buissonnantes qu'en deuxième année de culture et suivantes. La densité au champ pourrait ainsi ne pas avoir d'influence sur le rendement en feuilles la première année (Carneiro *et al.*, 1992). La seconde année, les meilleurs rendements ont été obtenus avec une densité de 100 000 plantes/ha, en comparaison à des densités de 50 000 et 80 000 plantes/ha (Carneiro *et*

al., 1992). Une densité à 200 000 plantes/ha a entraîné une faible croissance de la culture, due à une compétition pour la lumière et une diminution du ratio feuille/tige (Basuki et Sumaryono, 1990, cité par Ramesh *et al.*, 2006). Douze mois après la plantation, les racines s'étendent sur 30 cm de part et d'autre de la plante. Dans le cas d'une culture en conduite pluriannuelle, l'écartement devrait alors être supérieur à 30 cm de chaque côté (Ramesh *et al.*, 2006). Différents écartements ont été étudiés, allant de 20 à 60 cm inter-rangs et de 20 à 40 cm inter-plants (Espitia *et al.*, 2009 ; Singh *et al.*, 2011 ; Vasanthi *et al.*, 2011). Les résultats sont divergents quant à l'écartement optimal.

- Il a été observé comme étant de 30 x 20 ou 30 x 30 cm sur la base du rendement en feuilles et en tiges (Singh *et al.*, 2011).
- Un écartement de 45 x 22,5 cm pourrait permettre le plus haut rendement en feuilles et une absorption d'azote et de potasse élevée (Vasanthi *et al.*, 2011).
- Un écartement de 20 x 20 cm permettrait d'obtenir le rendement foliaire moyen le plus élevé (1,4 t MS/ha), dépassant les résultats obtenus avec l'écartement 40*40cm d'environ 80% (Espitia *et al.*, 2009).

2.2.4. Adventices et maladies

S. rebaudiana a une faible capacité de compétition avec les adventices pendant la première période de croissance, compte-tenu de son démarrage lent (Figure 3). Les adventices sont ainsi les premiers freins à l'établissement de la culture et à son rendement. La culture de *S. rebaudiana* nécessite par conséquent un contrôle des adventices aux premiers stades d'établissement de la culture. Par ailleurs, la présence d'adventices rend la récolte plus difficile et augmente leur stock de graines dans le sol (Ramesh *et al.*, 2006).

S. rebaudiana est susceptible de développer différentes maladies fongiques (Figure 3). La *Septoria steviae* est l'un des champignons qui infeste *S. rebaudiana*. La maladie fongique qui lui est associée se traduit par des lésions vert olive sur les feuilles, qui se fondent rapidement les unes aux autres et sont généralement entourées par un halo chlorotique. Les feuilles se nécrosent rapidement et se détachent souvent de la plante (Reeleder, 1999). Certains génotypes peuvent présenter un haut niveau de résistance/tolérance à la *Septoria steviae*, laissant entrevoir une possibilité de sélection sur ce critère (Reeleder, 1999).



Figure 3: (A) Jeune plant de *S. rebaudiana* en compétition avec du liseron ; (B) et (C) Symptômes foliaires de maladies fongiques observés chez *S. rebaudiana.*

Une maladie de pourriture des feuilles due à l'agent pathogène *Alternaria alternata* a également été identifiée. Cette maladie se traduit par des petites taches circulaires marron clair sur les feuilles, qui peuvent évoluer vers des couleurs plus foncées (marron foncé, gris) et des formes plus irrégulières. Certaines de ces taches se regroupent pour former de plus grandes zones nécrotiques.

Une autre maladie foliaire, causée par le champignon *Alternaria steviae,* a été observée, dont les premiers symptômes se traduisent par l'apparition de petites taches sur les feuilles, similaires à celles causées par *Septoria steviae*. Les taches s'étendent ensuite en formes irrégulières de couleur noire, entourées d'une zone chlorotique. Ces taches apparaissent également sur les tiges et les pétioles (Ishiba *et al.*, 1982). Parmi différentes lignées étudiées, certaines ont là-encore montré une meilleure résistance/tolérance au pathogène, laissant à nouveau entrevoir une possibilité de sélection (Ishiba *et al.*, 1982).

Sclerotinia sclerotiorum provoque une maladie de pourriture de la tige chez *S. rebaudiana*. Les tiges infestées présentent des lésions marron foncé. Si les symptômes se limitent aux ramifications, il y a un flétrissement partiel des feuilles. Quand les symptômes apparaissent à la base des tiges principales et au niveau des racines, un flétrissement de la plante entière est observé (Chang *et al.*, 1997).

Le champignon *Sclerotium rolfsii* provoque quant à lui une maladie de pourriture des racines. Les premiers symptômes de cette maladie sont un jaunissement et une fanaison des feuilles, accompagnés d'un flétrissement de la plante. Des filaments blancs (mycélium du champignon) apparaissent au niveau du collet puis se développent vers les racines et la tige, entraînant leur décomposition (Kamalakannan *et al.*, 2007).

D'autres agents pathogènes de *S. rebaudiana* ont été identifiés : *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizoctonia solani* et *Sclerotium dephinii* (Maiti *et al.*, 2007).

2.2.5. Récolte

Le rendement de *S. rebaudiana* s'exprime en masse de glycosides de stéviol (SVglys) produits par hectare ($kg.ha^{-1}$). Il dépend donc de l'élaboration de la biomasse foliaire et de l'accumulation en SVglys dans les feuilles. Il est généralement admis que la teneur maximale en SVglys ($mg.g^{-1}$ MS) est atteinte lors de la formation des bourgeons floraux (Ceunen et Geuns, 2013c). Les résultats divergent ensuite : lors de la floraison, la teneur en SVglys peut décroître, de 20 % (Mitsuhashi *et al.*, 1975) à 35-50% (Bian, 1981 ; Vanidze *et al.*, 2009 ; Ceunen *et al.*, 2011), ou stagner (Zaidan *et al.*, 1980 ; Ceunen *et al.*, 2011). L'accumulation de biomasse se fait quant à elle durant toute la période végétative. L'optimum de récolte est donc défini au stade bouton floral (Brandle *et al.*, 1998), en septembre sous nos climats. Au Canada, une récolte au stade bouton floral a permis d'obtenir un rendement de 3,1 t $MS.ha^{-1}$, avec une teneur en stévioside de 104,7 $mg.g^{-1}$ (Brandle et Rosa, 1992). La récolte peut aussi être obtenue au moyen de plusieurs coupes durant la période végétative (Carneiro, 1990). En Italie, si la conduite est bien réalisée, avec des apports d'eau suffisants afin de couvrir les besoins de la plante l'été, deux coupes par année peuvent être envisagées (Andolfi *et al.*, 2006).

S. rebaudiana peut être cultivée comme une plante annuelle, comme au Canada (Shock, 1982 ; Brandle *et al.*, 1998), ou pluriannuelle lorsque le climat le permet. En Italie, plusieurs études en vue d'une conduite pluriannuelle de *S. rebaudiana* ont été réalisées. La biomasse foliaire ($g.plante^{-1}$) peut augmenter jusqu'en $5^{ème}$ ou $6^{ème}$ année de production, avec un ratio feuilles/plante entière relativement stable les 2 premières années, qui augmente la 3ème année et qui tend à diminuer à partir de la $4^{ème}$ année, avec le nombre répété des coupes et l'augmentation du nombre de ramifications (Andolfi *et al.*, 2006). Dans une autre étude, le déclin du rendement a été observé à partir de la troisième année : le rendement en feuilles était de 13,3 $t.ha^{-1}$ la première année et de 9 $t.ha^{-1}$ la troisième année (Ruta *et al.*, 1999). La survie des plantes pendant l'hiver reste le premier facteur à maîtriser pour une culture pluriannuelle de *S. rebaudiana* : la pourriture des racines peut conduire à une grande perte des plantes au cours de l'hiver (Lavini *et al.*, 2008).

3. DOMESTICATION DE L'ESPECE

3.1. Modes de propagation de l'espèce et sélection variétale

A l'instar des plantes aromatiques ou médicinales, un enjeu pour la production de *S. rebaudiana* est d'obtenir un matériel de propagation adapté à une culture à grande échelle. Les modes et objectifs de sélection variétale ne seront pas les mêmes selon le mode de propagation choisi : propagation sexuée (semis) ou asexuée (bouturage, micropropagation).

3.1.1. Sélection variétale en vue d'une propagation sexuée

Les taux de germination des graines de *S. rebaudiana* sont réputés faibles (Shock, 1982). Ils présentent donc un frein à la propagation de cette plante par semis pour une culture à grande échelle. Ils peuvent néanmoins varier selon les conditions de germination.

- Le taux de germination des graines sans pappus est de 84,5%, alors qu'il est de 61,7% pour les graines avec pappus. Une élimination du pappus permettrait d'augmenter la surface de contact entre la graine et son substrat, d'accroître l'absorption de l'eau par la graine et favoriserait ainsi sa germination (Carneiro et Guedes, 1992). Une élimination mécanique du pappus peut néanmoins abîmer la graine et causer une augmentation du nombre de plantules anormales (Carneiro, 1990).
- Avec un taux de germination des graines de *S. rebaudiana* plus élevé en présence de lumière que dans le noir, plusieurs auteurs soutiennent une photosensibilité positive des graines de *S. rebaudiana* (Brandle *et al.*, 1998 ; Goettemoeller et Ching, 1999; Abdullateef et Osman, 2011). Cependant, une étude montre un meilleur taux de germination en présence de lumière pour 3 cultivars seulement, sur les 5 étudiés (Macchia *et al.*, 2007).
- La gamme de température optimale pour la germination se situerait entre 15 et 30°C, en fonction du cultivar (Macchia *et al.*, 2007).
- Le substrat dans lequel sont semées les graines influe également sur leur germination et le développement des pousses. Un sol léger, argilo-sableux et calcaire serait le meilleur substrat, quand le moins bon serait un sol lourd, argileux (Carneiro *et al.*, 1997).

- Le mode de conservation a aussi un effet sur la qualité germinative des graines. Une conservation des graines entre -10°C et -18°C permettrait d'assurer leur viabilité pendant plus de trois ans, quand elle n'est que de quelques mois à température ambiante (Chen *et al.*, 1995, cité par Macchia *et al.*, 2007).

En vue d'une propagation par semis, compte-tenu de l'auto-incompatibilité observée chez *S. rebaudiana*, la sélection récurrente apparaît comme la méthode la plus effective pour une augmentation du rendement foliaire et de la teneur totale en SVglys (Yadav *et al.*, 2011). C'est une méthode de sélection utile pour l'amélioration de caractères quantitatifs héritables chez les espèces allogames. Elle consiste en la sélection de plantes issues d'une population obtenue par inter-croisement et choisies pour leur phénotype. Les plantes obtenues à l'issue d'un cycle de sélection sont apparentées, chaque plante ayant été fécondée par l'ensemble des autres plantes. On parle pour un tel schéma de sélection familiale demi-frères (Gallais, 1989).

Les variétés synthétiques sont obtenues à l'issue de plusieurs cycles de sélection récurrente. La variété commercialisée correspond toujours à la même génération, obtenue avec le même matériel de départ. Le développement de ce genre de variétés est adapté pour les plantes dont le contrôle de la pollinisation est difficile. Cela permet la création rapide de variétés pour des plantes non encore intensivement sélectionnées, en utilisant une méthode à moindres coûts. Une caractéristique des variétés synthétiques est leur aspect « aléatoire » : de nombreuses sources de variation existent d'un lot à l'autre, la non-homogénéité de pollinisation par exemple (Gallais, 1989). Dans le cas d'une propagation sexuée de *S. rebaudiana*, le développement de variétés synthétiques apparaît comme la méthode la plus adaptée pour le développement d'une variété enrichie en rébaudioside A (RA) et ayant une teneur en SVglys élevée (Yadav *et al.*, 2011).

Une variété synthétique, « AC Blackbird », a été développée. Elle est caractérisée par une teneur totale en SVglys d'au moins 14%, et pouvant aller jusqu'à 18,8% et par un ratio RA/ST élevé, d'au moins 9,1 :1 et pouvant aller jusqu'à 11,0 :1 (Brandle, 2001). Une variété synthétique a également été développée par Morita et Yucheng (1998). Elle contient au moins 2,6 fois plus de RA que de ST.

3.1.2. Sélection variétale en vue d'une propagation asexuée

La propagation végétative de *S. rebaudiana*, réalisée par bouturage ou micropropagation, peut venir en renfort à sa propagation sexuée : des plantes obtenues par micropropagation ont montré un taux de survie de 95% après transplantation en champ (Preethi *et al.*, 2008). Les plantes produites *in vitro* ne montrent pas de comportement anormal au champ (Tamura *et al.*, 1984b ; Preethi *et al.*, 2008). Elles ne présentent donc pas d'effets indésirables liés à l'utilisation d'hormones pour l'induction des différentes pousses *in vivo* (Tamura *et al.*, 1984b).

Les boutures de *S. rebaudiana* s'enracinent facilement. Les meilleures boutures sont obtenues à partir de la partie supérieure de la plante (Shock, 1982). La bouture doit se faire à partir de d'une tige comportant 5 paires de feuilles opposées. Si les feuilles sont alternes, cela présage de la proximité temporelle de la floraison, ce qui diminue la qualité d'enracinement et le développement des boutures (Landázuri *et al.*, 2009). Une fois la bouture implantée, l'irrigation est un facteur essentiel, afin de favoriser un bon enracinement de la bouture (Landázuri *et al.*, 2009). La propagation par bouturage est limitée par le faible nombre d'individus pouvant être produits simultanément à partir d'une même plante (Jain *et al.*, 2009). De plus elle nécessite un coût important en main d'œuvre (Tamura *et al.*, 1984a). Elle peut donc être intéressante pour un travail à petite échelle, mais est probablement non-viable en termes économiques pour un travail à grande échelle (Brandle *et al.*, 1998). La micropropagation peut alors venir en alternative pour une propagation de masse. La culture *in vitro* de *S. rebaudiana* a fait l'objet de nombreuses études (Tamura *et al.*, 1984a ; Swanson *et al.*, 1992 ; Rajasekaran *et al.*, 2007 ; Banerjee et Sarkar, 2008 ; Preethi *et al.*, 2008 ; Sreedhar *et al.*, 2008 ; Jain *et al.*, 2009 ; Sadeak *et al.*, 2009 ; Shatnawi *et al.*, 2011; Zara *et al.*, 2014). Elle permet en effet l'obtention dans un milieu aseptisé d'un grand nombre de clones à partir d'une plante-mère.

Dans une optique de propagation asexuée de *S. rebaudiana*, une amélioration des plantes par sélection phénotypique de plantes individuelles présentant des caractéristiques intéressantes est adaptée. Une variabilité peut néanmoins être observée lors de la multiplication des plantes par clonage : en Chine, des clones issus d'une même plante-mère ont présenté une teneur totale en SVglys allant de 10,3% à 19,6%, avec une teneur en ST variant de 1,5 à 7,0% et une teneur en RA allant de 4,5 à 12,1% (Huang *et al.*, 1995).

Plusieurs variétés, dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 2, ont déjà été développées en vue d'une multiplication par clonage.

Tableau 2: Liste de quelques variétés de *S. rebaudiana* en vue d'une propagation par clonage.

Nom	Pays	Année	Caractéristiques	Références
Suweon 2	Corée	1979	Teneur élevée en ST	Lee *et al.* (1978)
Suweon 11	Corée	1981	Teneur élevée en RA, feuilles fines, nombreuses ramifications	Lee *et al.* (1982)
Yunri	Chine	1989	Teneur élevée en RA et ST	Shu (1989) ; Suhendi (1989)
Yunbing	Chine	1989	Teneur élevée en RA et ST	
Zongping	Chine	1995	Rendement et ratio RA/ST élevés	Shu (1995)
Ramonskaya slastena	Russie		Rendement de 0,62 t MS/ha, teneur en SVglys de 14.6%	Zhuzhzhalova *et al.* (2004)
Morita	Japon	1987	Ratio RA/ST de 91,1 :1 ; teneur en SVglys de 10,1%	Morita (1987)
CIMAP Madhu	Inde	2011	Rendement de 4.3 t MS/ha, teneurs en ST et RA de 12,6% et 5,8%,	Lal *et al.* (2011)
Gawi	Allemagne	2011	Adaptée aux conditions tempérées	Lankes et Zabala (2011)

Pour la production par clonage de *S. rebaudiana*, la qualité du système racinaire des plants revêt une importance capitale, afin de produire des plantes de qualité et homogènes. Un manque de vigueur des plants et un faible développement racinaire peuvent réduire la résistance de la plante à différentes pressions environnementales : un développement racinaire superficiel peut être défavorable à la résistance à la sécheresse, en empêchant la plante d'accéder aux réserves en eau des horizons profonds du sol. De même, il peut réduire la résistance au froid de la plante, de faibles températures entraînant le gel des eaux situées dans les horizons superficiels (Dondey, 1988). Les plants d'eucalyptus issus de boutures présentent généralement un enracinement plus faible et différent de celui des plantes obtenues par

semis : la majorité des racines des eucalyptus obtenus par bouturage sont situées dans les horizons superficiels du sol, alors que les plantes issues de semis développent un appareil racinaire pivotant (Dondey, 1988). Dans le cas de *S. rebaudiana*, le système racinaire des plantes issues de semis tend à être fasciculé, après avoir été pivotant la première année. Une attention doit être portée au système racinaire des plantes obtenues par bouturage pour une bonne implantation la première année.

Bien que génétiquement identiques, toutes les boutures issues d'une même plante-mère ne sont pas semblables. Une variabilité intra clonale existe pour des critères tels que la vigueur ou la résistance au froid. Le système racinaire et son développement pourraient être à l'origine d'une telle variabilité (Dondey, 1988). Il existe également une variabilité inter clonale : en fonction de la plante-mère considérée, sa descendance obtenue par clonage sera plus ou moins homogène (Dondey, 1988). La qualité du système racinaire est un point critique pour le développement de plantes vigoureuses et homogènes. Il est donc nécessaire de tenir compte de ce critère dans la sélection des plantes-mères en vue d'une propagation clonale. D'autres facteurs peuvent également favoriser la mise en place d'un bon développement racinaire des plants : plus les boutures sont jeunes, plus elles développent un système racinaire de qualité (Dondey, 1988). Un apport d'auxine peut également venir en aide au développement racinaire des boutures. L'auxine agit en effet sur la rhizogenèse, en favorisant l'apparition de racines sur les boutures (De Klerk *et al.*, 1999).

3.2. Critères de sélection

Les objectifs de sélection pour *S. rebaudiana* concernent différents caractères, parmi lesquels ceux relatifs aux SVglys (teneur totale en SVglys, teneur en RA, ratio RA/ST). Les caractéristiques morphologiques de la plante, telles que sa hauteur, son nombre de ramifications, son nombre de feuilles, l'indice de surface foliaire sont également à prendre en compte. Compte-tenu des besoins photopériodiques de *S. rebaudiana* pour son développement végétatif, il est nécessaire de développer des variétés précoces, afin d'assurer une production de SVglys optimale dans nos latitudes (Andolfi *et al.*, 2006). Enfin, des caractères tels que la sensibilité à la photopériode et la précocité de la plante, sa tolérance ou sa résistance aux maladies, à la sécheresse ou aux sols à pH élevé sont à prendre en compte (Yadav *et al.*, 2011).

3.2.1. Teneur et composition en glycosides de stéviol

Il existe une variabilité génétique suffisante pour obtenir des gains génétiques significatifs pour la teneur en RA et pour le ratio RA/ST (Brandle et Rosa, 1992 ; Brandle, 1999). Selon des résultats obtenus sur des familles demi-frères, l'héritabilité pour la teneur en ST est élevée (76%) (Brandle et Rosa, 1992). Un travail de sélection variétale peut donc être effectif sur ces critères.

Les teneurs totales en SVglys au stade de jeune plant et au stade bouton floral (récolte) ne sont pas corrélées (Nakamura et Tamura, 1985), ce qui suggère qu'une sélection réalisée aux premiers stades sur la teneur en SVglys n'est pas effective (Brandle *et al.*, 1998). Cependant, une sélection sur la composition en SVglys pourrait être faite à des stades précoces : les proportions individuelles des SVglys au stade de jeune plant sont corrélées à celles obtenues au stade bouton floral (Nakamura et Tamura, 1985).

3.2.2. Critères morphologiques

La variabilité génotypique de *S. rebaudiana* peut permettre d'obtenir des gains génétiques significatifs pour le rendement en feuilles (Brandle et Rosa, 1992 ; Brandle, 1999). Par ailleurs, l'héritabilité pour le ratio feuilles/tiges est de 79% (Brandle et Rosa, 1992). Une variabilité et une héritabilité suffisantes ont également été observées sur l'ensemble des critères suivants : longueur et largeur des feuilles, hauteur de la plante, nombre d'inflorescences, rendement en feuilles, nombre de feuilles par plante (Gaurav *et al.*, 2008).

Dans une étude, quatre morphologies de plante ont pu être distinguées, les facteurs discriminants étant le nombre d'axes dominants et le nombre de ramifications latérales (Figure 4). Les plantes les plus productives étaient celles n'ayant qu'une seule tige ou peu de ramifications et avec un ratio feuilles/tiges plus élevé (Tateo *et al.*, 1998). Les plantes de taille élevée ou au nombre de ramifications important ne produiraient en effet pas un nombre de feuilles significativement supérieur à celui des autres plantes (Raji Akintunde et Mohamad, 2011).

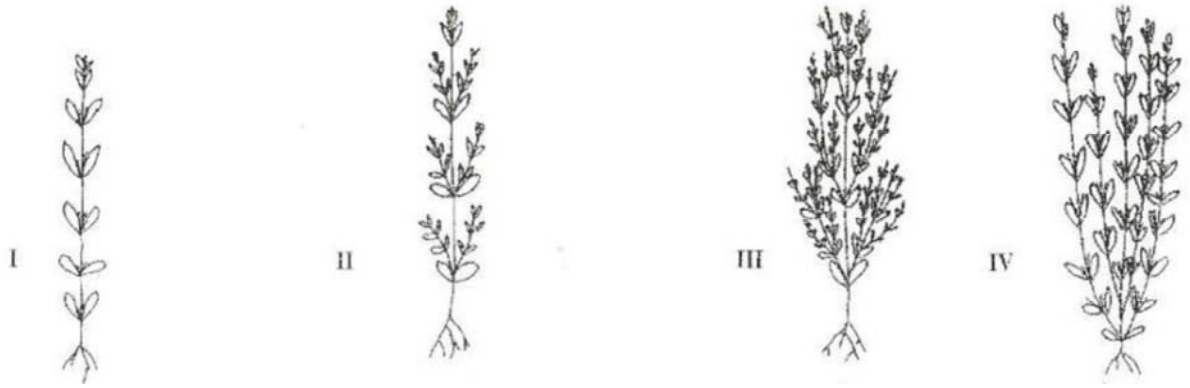


Figure 4: Caractéristiques morphologiques des quatre groupes de plantes obtenus dans l'étude de Tateo *et al.* (1998).

La surface des feuilles peut également être un critère intéressant, de grandes feuilles conduisant à une biomasse plus élevée que des petites. Cela pourrait permettre la production d'une plus grande quantité de SVglys (Raji Akintunde et Mohamad, 2011). Il a été démontré que la longueur des feuilles et le nombre d'inflorescences par plante sont corrélées négativement avec le rendement en feuilles, alors qu'il existe une corrélation positive entre la hauteur de la plante et le nombre de feuilles par plante (Gaurav *et al.*, 2008).

Il existe une variabilité et une héritabilité suffisantes pour réaliser un travail de sélection variétale sur la morphologie des plantes et leur capacité productive. Dans son habitat d'origine, la teneur totale en SVglys des feuilles de *S. rebaudiana* varie entre 2 et 10% de la masse sèche des feuilles. Une trentaine d'années de sélection, basée sur des caractères phénotypiques, a permis d'atteindre des teneurs approchant 20% de la masse sèche des feuilles (Yadav *et al.*, 2011).

Chapitre 2 : Les glycosides de stéviol

1. CARACTERISTIQUES

1.1. Structure chimique

S. rebaudiana a été le sujet de nombreuses études phytochimiques, qui ont permis l'identification de nombreuses molécules. La plupart des études a eu pour objet les isoprénoïdes, et plus spécifiquement les glycosides de stéviol (SVglys). Des informations sur les autres composés identifiés chez *S. rebaudiana* sont présentes dans les revues de Kenelly (2002), McGarvey *et al.* (2003), Manish *et al.* (2006), Wölwer-Rieck (2012) et Lemus-Mondaca (2012).

Les SVglys sont des glycosides diterpènes ent-kaurène tétracycliques organisés autour d'un noyau de stéviol (SV) (Figure 5). Ils diffèrent les uns des autres essentiellement par le nombre d'unités de sucre liées au SV, allant généralement de un à quatre, mais pouvant aller jusqu'à sept. Les unités de sucre sont essentiellement du *β*-glucose (Glc) et, dans une moindre mesure, du *α*-rhamnose (Rhm), du *β*-xylose (Xyl) et du *β*-fructose (Fru).

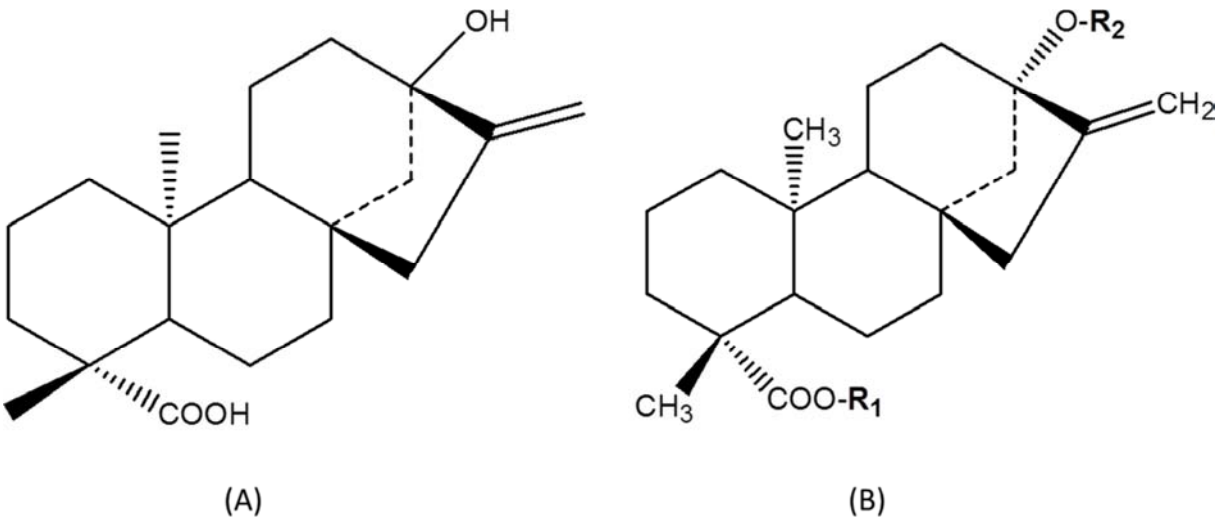


Figure 5: (A) Noyau de stéviol et (B) Structure commune aux glycosides de stéviol.
Les radicaux R1 et R2 de chacun des glycosides de stéviol sont décrits dans le Tableau 3.

Jusqu'au début des années 2000, neuf SVglys avaient été identifiés chez *S. rebaudiana* : le stévioside (ST) (Bridel et Lavieille, 1931), les rébaudioside A et B (Kohda *et al.*, 1976), C (Sakamoto *et al.*, 1977a), D et E (Sakamoto *et al.*, 1977b), F (Starratt *et al.*, 2002), le dulcoside A (Kobayashi *et al.*, 1977) et le stéviolbioside (Kohda *et al.*, 1976). La composition en SVglys dans les feuilles de *S. rebaudiana* varie selon le génotype, mais la composition la plus communément retrouvée, dans les populations sauvages, est la suivante (en pourcentage de masse sèche des feuilles): 5-10% ST, 2-5% RA, 1% RC, 0,5% DA, 0,2% rébaudiosides D, E et F, et 0,1% stéviolbioside (Ceunen et Geuns, 2013a). Ces dernières années, de nombreux SVglys ont été détectés en petite quantité dans les feuilles de *S. rebaudiana*, sur des cultivars d'origine différentes. On recense à l'heure actuelle plus de trente SVglys (Tableau 3) (Ceunen et Geuns, 2013a). Les propriétés organoleptiques des SVglys les plus récemment identifiés n'ont pas encore été établies.

Tableau 3: Liste des glycosides de stéviol connus chez *S. rebaudiana*.

Famille [a]	Nom	R1	R2	Formule	Pouvoir sucrant [b]	Référence [c]
	Stéviol	H	H	$C_{20}H_{30}O_3$		Minne *et al.* (2004)
	Stéviolmonoside	H	Glc*β*1-	$C_{26}H_{40}O_8$		Ohta *et al.* (2010)
	stéviol-19-O-β-D-glucoside	Glc*β*1-	H	$C_{26}H_{40}O_8$		Gardana *et al.* (2010)
	Rubusoside	Glc*β*1-	Glc*β*1-	$C_{32}H_{50}O_{13}$		Ohta *et al.* (2010)
rebaudioside A family [Glcβ(1-2)[±Glcβ(1-3)]Glcβ1-]	Stéviolbioside	H	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	$C_{32}H_{50}O_{13}$	100-125	Kohda *et al.* (1976)
	Stévioside	Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	$C_{38}H_{60}O_{18}$	250-300	Bridel et Lavieille (1931)
	-	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	Glc*β*1-	$C_{38}H_{60}O_{18}$		Wu *et al.* (2012)
	rébaudioside E	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	$C_{44}H_{70}O_{23}$	150-300	Sakamoto *et al.* (1977b)
	rébaudioside B	H	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{38}H_{60}O_{18}$	300-350	Kohda *et al.* (1976)
	rébaudioside A	Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{44}H_{70}O_{23}$	300-450	Kohda *et al.* (1976)
	rébaudioside D	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{28}$	250-400	Sakamoto *et al.* (1977b)
	rébaudioside I	Glc*β*(1-3)Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{28}$		Ohta *et al.* (2010)
	rébaudioside M	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{56}H_{90}O_{33}$		Ohta *et al.* (2010)
	-	Glc*β*1-	Glc*β*(1-6)[Glc*β*(1-2)]Glc*β*1-	$C_{44}H_{70}O_{23}$		Chaturvedula et Prakash (2011d)
	rébaudioside L	Glc*β*1-	Glc*β*(1-6)Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{28}$		Ohta *et al.* (2010)
rebaudioside C family [Rhaα(1-2)[±Glcβ(1-3)]Glcβ1-]	dulcoside A	Glc*β*1-	Rha*α*(1-2)Glc*β*1-	$C_{38}H_{60}O_{17}$	50-120	Kobayashi *et al.* (1977)
	dulcoside B	H	Rha*α*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{38}H_{60}O_{17}$		Ohta *et al.* (2010)
	rébaudioside C	Glc*β*1-	Rha*α*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{44}H_{70}O_{22}$	50-120	Sakamoto *et al.* (1977a)
	rébaudioside H	Glc*β*1-	Glc*β*(1-3)Rha*α*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{27}$		Ohta *et al.* (2010)
	rébaudioside K	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	Rha*α*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{27}$		Ohta *et al.* (2010)
	rébaudioside J	Rha*α*(1-2)Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{27}$		Ohta *et al.* (2010)
	rébaudioside N	Rha*α*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{56}H_{90}O_{32}$		Ohta *et al.* (2010)
	rébaudioside O	Glc*β*(1-3)Rha*α*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{62}H_{100}O_{37}$		Ohta *et al.* (2010)

[a] les glycosides de stéviol sont regroupés en famille, comme dans Ohta et al. (2010) et Ceunen et Geuns (2013a) ; [b] les pouvoirs sucrants sont cités dans Kinghorn (2002) et Geuns (2010), où le pouvoir sucrant du saccharose est égal à 1 ; [c] les références correpondent au premier rapport sur la détection *in vivo* des glycosides de stéviol et leur caractérisation, d'après Ceunen et Geuns (2013a).

Tableau 3: Liste des glycosides de stéviol connus chez *S. rebaudiana*.

Famille [a]	Nom	R1	R2	Formule	Pouvoir sucrant [b]	Référence [c]
[Glc*β*(1-3)Glc*β*1-] family	rébaudioside G	Glc*β*1-	Glc*β*(1-3)Glc*β*1-	$C_{38}H_{60}O_{18}$		Ohta *et al.* (2010)
rebaudioside F family [Xylβ-]	-	Glc*β*1-	Xyl*β*(1-2)Glc*β*1-	$C_{37}H_{58}O_{17}$		Chaturvedula et Prakash (2011a)
	rébaudioside F	Glc*β*1-	Xyl*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{43}H_{68}O_{22}$		Starratt *et al.* (2002)
	-	Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Xyl*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{43}H_{68}O_{22}$		Chaturvedula et Prakash (2011a)
	-	Xyl*β*(1-6)Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	$C_{43}H_{68}O_{22}$		Chaturvedula *et al.* (2011a)
[Fru*β*-] family	-	Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Fru*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{44}H_{70}O_{23}$		Chaturvedula *et al.* (2011b)
[Glc*α*-] family	-	Glc*α*(1-2)Glc*α*(1-4)[Glc*β*1-	Glc*β*(1-2)Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{28}$		Chaturvedula et Prakash (2011b)
	-	Glc*β*1-	Glc*β*(1-3)Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{28}$		Chaturvedula *et al.* (2011c)
	-	Glc*β*1-	Glc*β*(1-4)Glc*β*(1-3)[Glc*β*(1-2)]Glc*β*1-	$C_{50}H_{80}O_{28}$		Chaturvedula *et al.* (2011c)
[6-deoxyGlc*β*-] family	-	Glc*β*1-	6-deoxyGlc*β*(1-2)Glc*β*1-	$C_{38}H_{60}O_{17}$		Chaturvedula et Prakash (2011c)
	-	Glc*β*1-	6-deoxyGlc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{44}H_{70}O_{22}$		Chaturvedula et Prakash (2011c)
	-	6-deoxyGlc*β*1-	Glc*β*(1-2)[Glc*β*(1-3)]Glc*β*1-	$C_{44}H_{70}O_{22}$		Venkata Sai Prakash (2011)

[a] les glycosides de stéviol sont regroupés en famille, comme dans Ohta *et al.* (2010) et Ceunen et Geuns (2013a) ; [b] les pouvoirs sucrants sont cités dans Kinghorn (2002) et Geuns (2010), où le pouvoir sucrant du saccharose est égal à 1 ; [c] les références correpondent au premier rapport sur la détection *in vivo* des glycosides de stéviol et leur caractérisation, d'après Ceunen et Geuns (2013a).

1.2. Caractéristiques organoleptiques

Une amertume (goût métallique/liquoreux) est souvent associée aux extraits purifiés de *S. rebaudiana* (Tanaka, 1997). Il est difficile de savoir si cette amertume est dûe à la présence d'un ou plusieurs composés présents dans l'extrait, ou est inhérente à la structure moléculaire des SVglys.

Certains auteurs arguent en faveur d'une amertume due à la présence de composés volatiles non décelés lors de l'extraction des SVglys. Des phénols, des sesquiterpènes et des alcaloïdes ont été identifiés comme les principaux produits secrétés par les trichomes glandulaires, tant sur les feuilles que sur les inflorescences. Les sesquiterpènes non-oxygénés et les monoterpènes non-oxygénés ont été identifiés comme les principaux composants de la fraction la plus volatile et comme les principaux responsables du goût des feuilles et des fleurs, quand les terpènes oxygénés joueraient probablement un rôle mineur (Cornara *et al.*, 2001). Parmi ces produits, deux sesquiterpènes, le spathulénol et le carophyllène, ont été isolés (Cornara *et al.*, 2001). Ils ont été décrits comme contribuant de manière décisive à l'arrière-goût des SVglys (Tsanava *et al.*, 1991). Plus récemment, un nouvel alcaloïde indolizidinique a été identifié chez *S. rebaudiana*, la steviamine (Michalik *et al.*, 2010). Aucune étude n'a encore rapporté l'effet des alcaloïdes indolizidiniques sur le goût perçu par les humains, mais il est suggéré qu'ils puissent avoir un effet sur le goût sucré des SVglys (Michalik *et al.*, 2010). Les alcaloïdes indolizidiniques étant difficiles à détecter par les dispositifs analytiques les plus communément utilisés et ayant une solubilité similaire à celle des SVglys, ils pourraient être présents dans les extraits de *S. rebaudiana* utilisés comme agents sucrants (Michalik *et al.*, 2010).

D'autres études ont testé l'hypothèse d'une relation entre la structure chimique et le goût des SVglys (Dubois et Stephenson, 1985 ; Jooken *et al.*, 2013). L'amertume des SVglys pourait être liée au caractère hydrophile de la molécule, une augmentation de la polarité des SVglys entraînant une diminution de leur goût amer (Dubois et Stephenson, 1985). Selon l'étude de Jooken *et al.* (2013), la présence d'un *β*-glucose au niveau du groupement carboxyl du stéviol (position C_{19}) serait de faible importance pour les caractéristiques organoleptiques des SVglys. Le nombre d'unités de sucre attachées au groupement hydroxyl du stéviol (position C_{13}) pourrait, en revanche, influer sur les caractéristiques organoleptiques des SVglys, les composés les moins amers ayant un nombre plus élevé d'unités de sucre. Par ailleurs, la nature des unités de sucre (*β*-glucose, *α*-rhamnose ou *β*-xylose) n'est pas apparue

déterminante lors de l'évaluation de l'amertume des SVglys (Jooken *et al.*, 2013). Néanmoins, les échantillons utilisés dans cette étude étaient des mélanges de SVglys aux compositions différentes et les effets de synergie entre les différents SVglys n'ont pu être mesurés (Jooken *et al.*, 2013). Il reste difficile à ce jour d'identifier les caractéristiques organoleptiques propres à chaque SVglys. La limite majeure vient de la difficulté à séparer les SVglys à partir d'extraits bruts à un rendement et à un degré de pureté suffisamment élevés afin d'effectuer des analyses sensorielles individuelles pour chaque SVglys. Un travail par chromatographie de partage centrifuge (CPC) a été réalisé par l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims, afin de proposer une technique pour isoler les SVglys individuellement, à une échelle multigramme. Les résultats de cette étude, fruit d'une collaboration entre l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims, Stevia Natura et l'INP-EI Purpan ont été été valorisés par une publication scientifique présentée en Annexe de ce manuscrit de thèse :

Intensified Separation of Steviol Glycosides from a Crude Aqueous Extract of *Stevia rebaudiana* Leaves Using Centrifugal Partition Chromatography

Jane Hubert, Nicolas Borie, Sébastien Chollet, Joël Perret, Claire Barbet-Massin, Monique Berger, Jean Daydé et Jean-Hugues Renault

Planta Medica (2015) 81, 1‑7

1.3. Extraction et dosage des glycosides de stéviol

La plupart des protocoles d'extraction des SVglys proposent l'eau comme solvant d'extraction. Des procédés d'extraction à partir de chloroforme, méthanol ou extraction par fluide supercritique ont également été décrits. Différents procédés de purification peuvent ensuite être mis en oeuvre, tels que l'extraction en phase solide (SPE) (Woelwer-Rieck *et al.*, 2010). Les SVglys peuvent être aussi purifiés par recristallisation, parfois couplée à de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Ceunen et Geuns, 2013a).

Après la découverte du RA en 1975, de nombreuses méthodes analytiques ont été développées pour le dosage des SVglys : la chromatographie, l'électrophorèse, la méthode enzymatique et la spectroscopie proche infrarouge (SPIR) (Brandle *et al.*, 1998). Aujourd'hui, la méthode la plus communément utilisée pour le dosage des glycosides est la

chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) (Brandle *et al.*, 1998 ; Woelwer-Rieck, 2012). De nombreux protocoles existent, proposant l'utilisation de différentes colonnes : les colonnes en phase inverse (C18) ou en phase amine (NH_2) comptent parmi les premières utilisées. Plus récemment, les colonnes HILIC (Hydrophilic Liquid Interaction Chromatographic) ont été utilisées pour le dosage des SVglys (Woelwer-Rieck, 2012).

L'HPLC est une méthode coûteuse, qui nécessite une longue préparation des échantillons. La mise en oeuve des programmes de sélection serait considérablement facilitée par le développement d'une méthode rapide et précise qui permettrait un criblage des plantes à grande échelle et à faible coût. Deux méthodes ont été étudiées en alternative à l'HPLC : la spectroscopie de résonnance magnétique nucléaire (RMN) quantitative et la spectroscopie proche infrarouge (SPIR). La méthode RMN propose un temps d'analyse quatre fois plus rapide que l'HPLC et ne nécessite pas de standards de référence (Pieri *et al.*, 2011). Quatre SVglys ont pu être dosés par RMN : le ST, le RA, le RB et le RC (Pieri *et al.*, 2011). Les SVglys mineurs n'ont néanmoins pas pu être détectés, compte-tenu de leur faible teneur, alors qu'ils ont été détectés par HPLC (Joint FAO/WHO Expert Comittee on Food Additives, 2010). La SPIR est une méthode couramment utilisée pour déterminer la teneur en métabolites secondaires dans les plantes (Hearn et Subedi, 2009 ; Montes *et al.*, 2013 ; Pissard *et al.*, 2013). Selon l'étude de Hearn et Subedi (2009), les trois SVglys majeurs (ST, RA et RC) ont pu être estimés avec cette méthode. Dans l'étude de Yu *et al*. (2011), un modèle a pu être établi pour estimer les teneurs en RA et ST dans les feuilles *S. rebaudiana*. La SPIR est un outil de mesure rapide et non destructif. Il est généralement utilisé sur feuilles sèchées (et broyées). Des appareillages portatifs existent aussi, permettant de faire des mesures en direct sur les plantes. Un tel dispositif permettrait de réaliser un screening rapide des plantes en vue d'un travail de sélection. Cet outil pourrait également être utilisé par l'aval de la filière, pour le tri des lots de feuilles récoltées par exemple.

2. BIOSYNTHESE DES GLYCOSIDES DE STEVIOL

2.1. Distribution des glycosides de stéviol dans la plante

L'accumulation des SVglys a principalement lieu dans les feuilles de *S. rebaudiana*. Ils sont présents en quantité beaucoup plus faible dans les autres organes de la plante (fleurs, tiges, graines, racines), comme résumé dans le Tableau 4.

Tableau 4: Teneur en glycosides de stéviol dans les différents organes de la plante, exprimée en valeur relative par rapport à la teneur observée dans les feuilles.

	Teneur en glycosides de stéviol (% par rapport aux feuilles)			
Organe	RA et RC	ST	ST	RA
Feuilles	100	100	100	100
Fleurs	12,5-14,3	40	-	-
Tiges	7,7-8,3	Traces	78	7
Graines	5,9-6,3	-	-	-
Racines	< 2,5	Aucune trace	52	0
Référence	Bondarev *et al.* (2003)	Zaidan *et al.* (1980)	Kumar H. *et al.* (2012a)	Kumar H. *et al.* (2012a)

2.2. Voie de biosynthèse des glycosides de stéviol

Le diterpène stéviol (SV), partie aglycone des SVglys, est synthétisé à partir de la voie de biosynthèse du 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) (Figure 6), qui a lieu dans les chloroplastes et dont les précurseurs sont le pyruvate et la glycéraldéhyde 3-phosphate (G_3P) (Totte *et al.*, 2000). Cette voie contribue aussi à la synthèse de mono-, di- et tetraterpènes, tels des pigments photosynthétiques (chlorophylles, caroténoides) et des hormones (gibbérellines, acide abscissique) (Cordoba *et al.*, 2011). La voie conduisant à la formation des SVglys à partir du SV est ensuite spécifique.

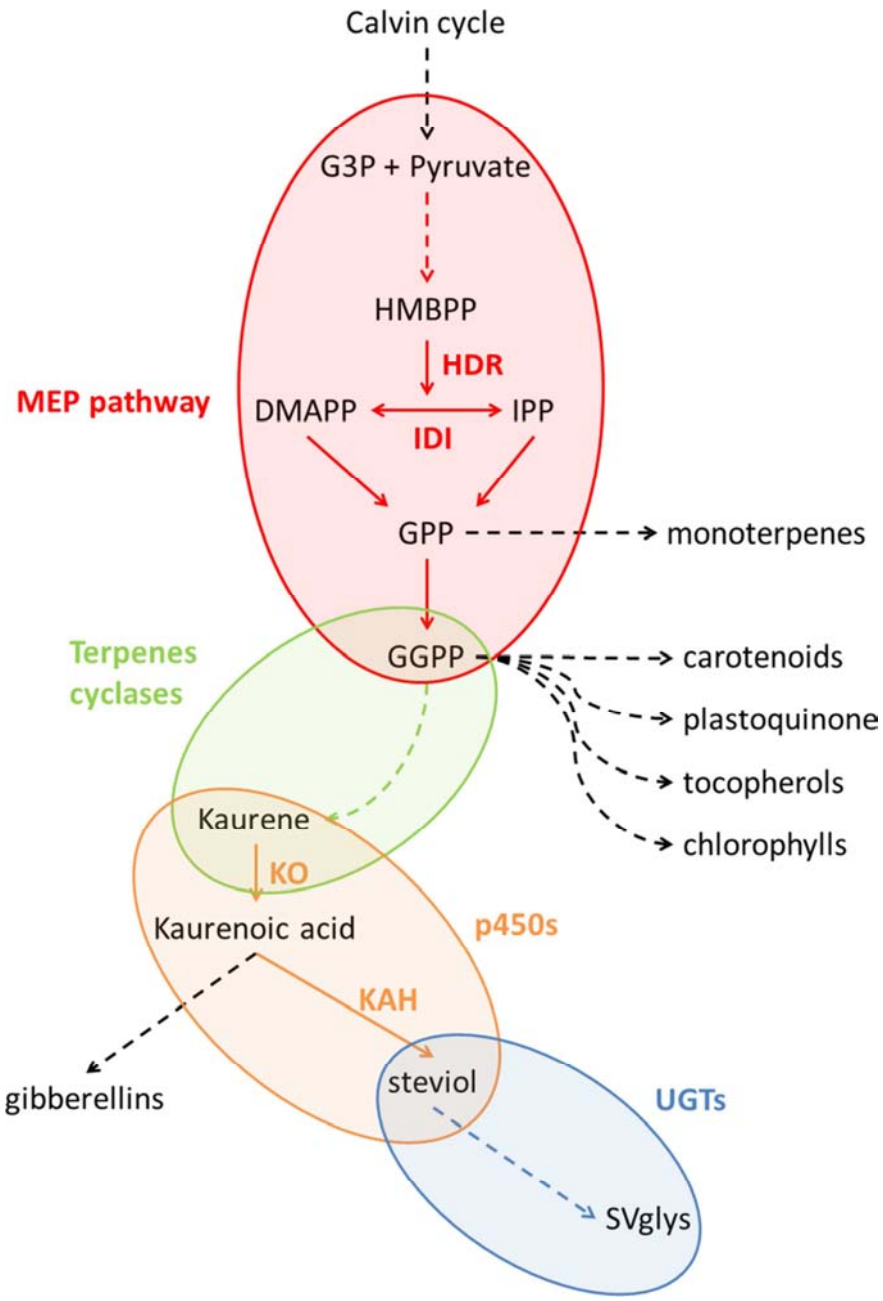


Figure 6: Représentation schématique de la voie du MEP, conduisant à la formation des SVglys. G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; HMBPP, 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate; IPP, isopentenyl diphosphate; DMAPP, dimethylallyl diphosphate; HDR, HMBPP reductase; IDI, IPP isomerase; GPP, Geranyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; KO, kaurene oxidase; KAH, kaurenoic acid hydroxylase; UGTs, UDP-dependant glycosyltransferases.

2.2.1. Voie du MEP

La première enzyme qui intervient dans la voie de biosynthèse du MEP est la deoxyxyulose-5-phosphate synthase (DXS) : elle catalyse la synthèse du deoxyxyulose-5-phosphate (DXP) à partir de pyruvate et de glycéraldhéhyde-3-phosphate (Figure 7). La DXP reductoisomerase (DXR) réduit ensuite le DXP pour former le MEP (Brandle et Telmer,

2007). Le MEP est ensuite converti en isopentenyl diphosphate (IPP) et en dimethylallyl diphosphate (DMAPP) sous l'action successive de la 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl- D-erythritol synthase (CMS), de la 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl- D-erythritol kinase (CMK), de la 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl- D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MCS), de la 1-hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate synthase (HDS) et de la 1-hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (HDR) (Brandle et Telmer, 2007). Ces deux dernières molécules sont converties en geranylgeranyl diphosphate par la GGDP synthase (Brandle et Telmer, 2007). L'ensemble des gènes codant pour les différentes enzymes de cette voie a été cloné et identifié chez *S. rebaudiana* (Totte *et al.*, 2003 ; Kumar H. *et al.*, 2012a).

2.2.2. Terpènes cyclases

Deux étapes de cyclisation du GGDP conduisent à la formation du kaurène (Figure 8). Ces deux étapes sont communes aux voies de biosynthèse de l'acide gibbérellique et du stéviol. La première étape consiste en une cyclisation initiée par protonation du GGDP pour former le copalyl diphosphate (CDP), catalysée par la CDP synthase (CPS). Le kaurène est ensuite synthétisé à partir du CDP, par une cyclisation catalysée par la kaurène synthase (KS). Ces deux enzymes (KS et CPS) ont été identifiées chez *S. rebaudiana* (Richman *et al.*, 1999). La transcription des gènes codant pour CPS et KS a été détectée de manière très apparente dans les feuilles, et plus précisément dans le mésophile et le parenchyme palissadique. Aucun signal n'a été détecté dans les trichomes, l'épiderme ou le tissu vasculaire (Richman *et al.*, 1999). *S. rebaudiana* a integré, au fil de l'évolution de son génome, deux gènes de la voie de biosynthèse hautement régulée de l'acide gibbérellique pour son métabolisme secondaire. Le gène qui code pour la KS est dupliqué dans son génome (KS1-1 et KS22-1). Par ailleurs, les enzymes CPS et KS sont hautement exprimées dans les feuilles d'âge mûr. Dans la plupart des plantes, les gènes qui codent pour ces enzymes ont un faible niveau d'expression, limitée aux tissus à croissance rapide. Il a alors été suggéré une séparation spatio-temporelle de la synthèse de l'acide gibbérellique et des SVglys, afin de prévenir une surexpression de l'acide gibbérellique (Richman *et al.*, 1999).

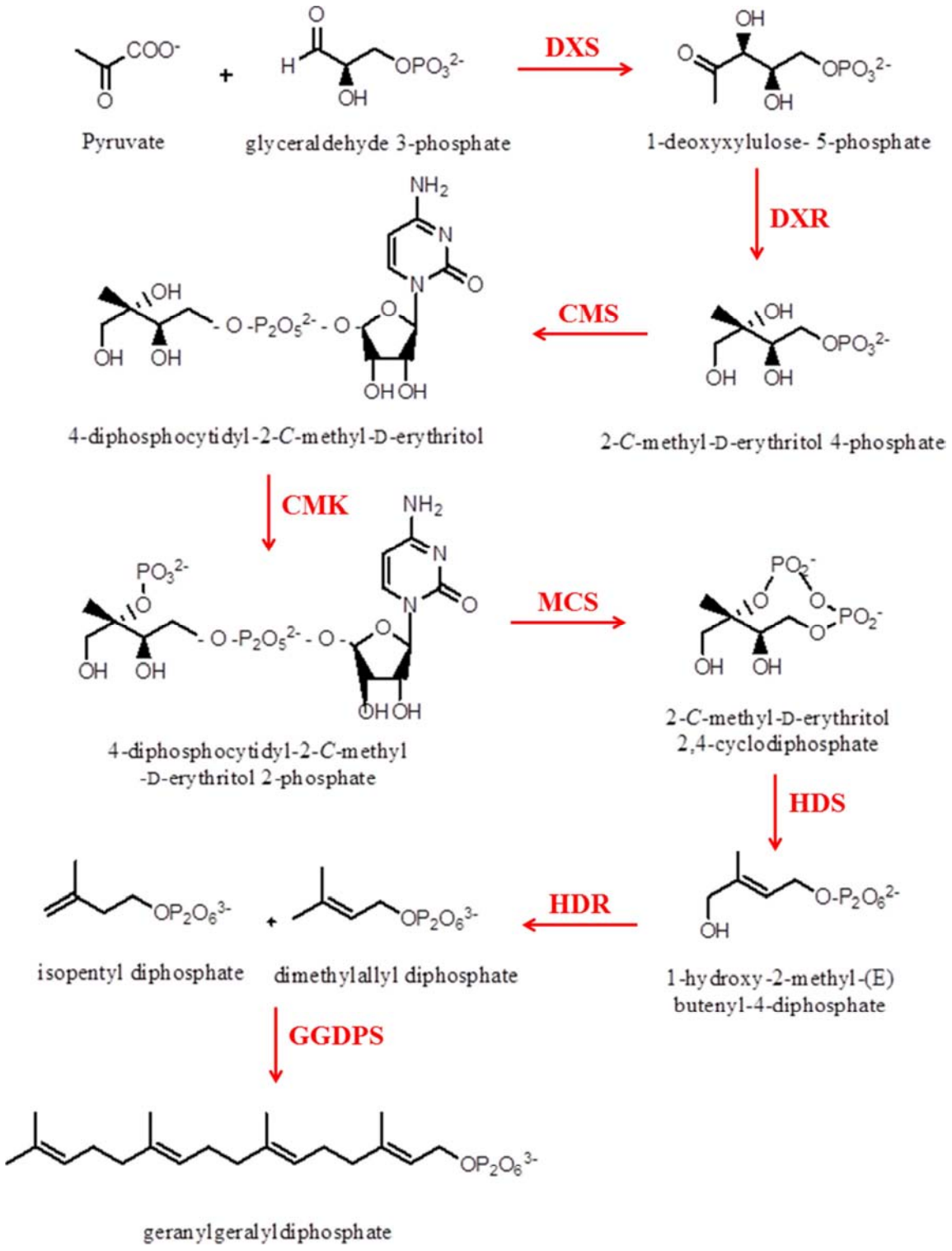


Figure 7: Voie du du 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP), conduisant à la formation de la geranylgeranyldiphosphate.

DXS, deoxyxylulose-5-phosphate (DXP) synthase ; DXR, DXP reductoisomerase ; CMS, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase ; CMK, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl- D-erythritol kinase ; MCS, 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl- D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase ; HDS, 1-hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate synthase ; HDR, 1-hydroxy-2-methyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate reductase ; GGDPS, geranylgeranyldiphosphate synthase.

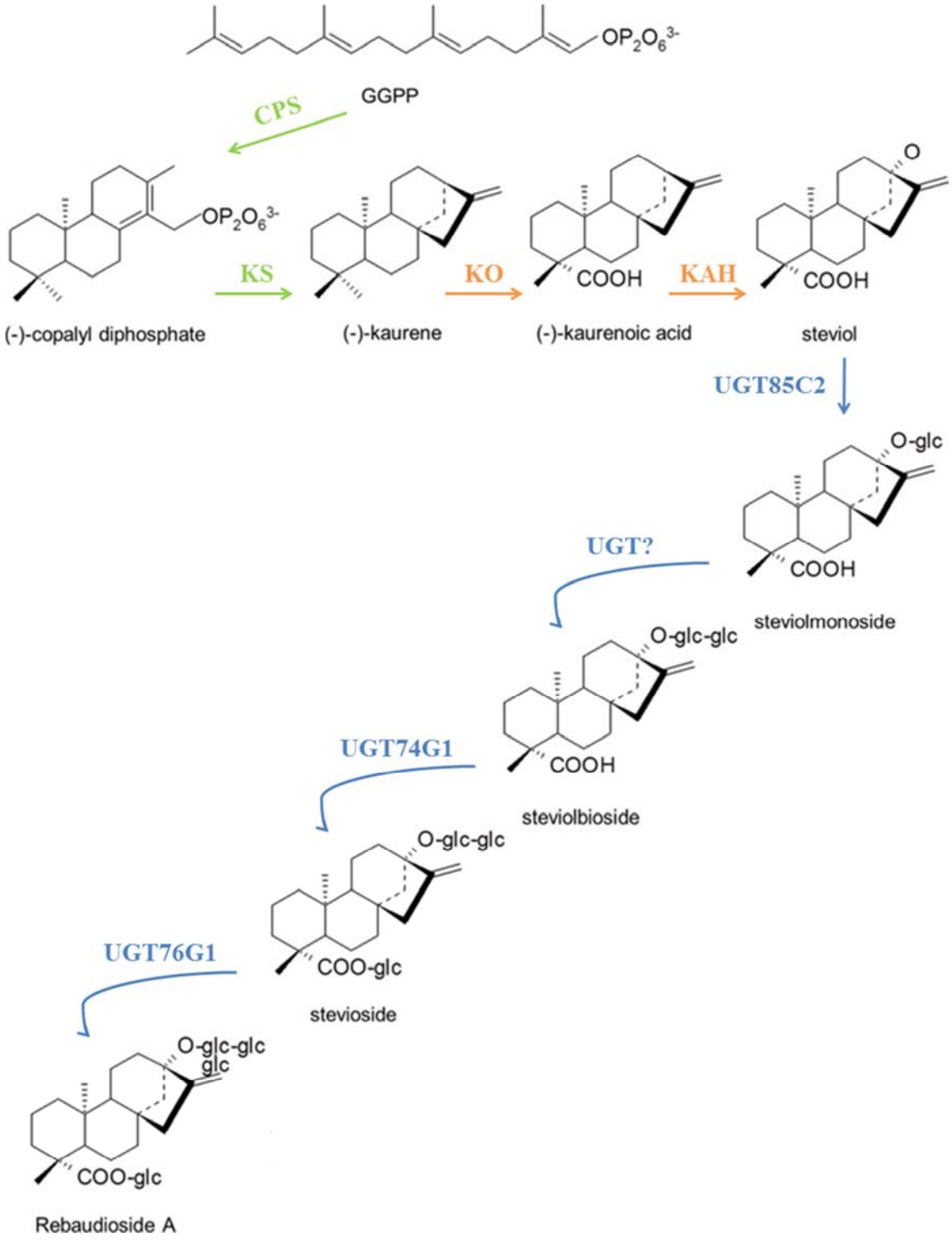


Figure 8: Voie de biosynthèse du stéviol et des principaux glycosides de stéviol à partir de la geranylgeranyldiphosphate.
CPS, copalyl diphosphate synthase ; KS, kaurene synthase ; KO, kaurene oxidase ; KAH, kaurenoic acid hydroxylase ; UGTs, UDP-dependant glycosyltransferases.

2.2.3. Cytochromes p450

Les plantes utilisent un large éventail de mono oxygénases, les cytochromes P450 (P450), dans leurs voies de biosynthèse ou de détoxification. Ces molécules interviennent dans des réactions d'oxydoréduction : elles utilisent du NAD(P)H et de l'oxygène pour ajouter un atome d'oxygène au substrat. Les CYP450 jouent un rôle primordial dans la synthèse d'intermédiaires de la lignine, des stérols, des terpènes, des flavonoïdes, des isoflavonoïdes, et d'une large gamme d'autres métabolites secondaires (Schuler, 1996).

Une fois formé, le kaurène est oxydé par une réaction en trois étapes, pour former l'acide kaurénoïque (Figure 8). Cette étape est catalysée par un cytochrome p450, la kaurène oxidase (KO), également impliquée dans la synthèse de l'acide gibbérellique (Brandle *et al.*, 2002 ; Humphrey *et al.*, 2006). Comme le gène codant pour KS, le gène qui code pour KO est dupliqué dans le génome de *S. rebaudiana* (Brandle *et al.*, 2002). A l'instar des gènes codant pour CPS et KS, il est hautement exprimé dans les feuilles d'âge mûr (Humphrey *et al.*, 2006). S'il est tentant de supposer que la duplication des gènes KS et KO permette de spécialiser les enzymes, chacune pour l'une des voies de biosynthèse, rien n'a encore été démontré pour supporter cette hypothèse (Brandle et Telmer, 2007).

La voie de biosynthèse du stéviol diverge ensuite de celle de l'acide gibbérellique. L'acide kaurénoïque est hydroxylé par la kaurenoic acid hydroxylase (KAH) en position 13 pour former le stéviol (Kim *et al.*, 1996). Pour la formation de l'acide gibbérellique, une oxydation par la kaurenoic acid oxigenase (KAO) se fait en position 7. Le gène qui code pour l'enzyme KAH a été caractérisé par Brandle et Richman (2011).

2.2.4. Glycosyltransferases

Les UDP-glycosyltransferases (UGTs) sont des enzymes qui catalysent le transfert d'une molécule de glucose vers une molécule acceptrice, altérant ainsi sa solubilité, son activité, sa toxicité ou son transport (Humphrey *et al.*, 2006). Le stéviol, en forme libre dans la plante, pourrait avoir une *gibberellin-like* activité, nuisible à la plante, compte-tenu de proportions élevées de stéviol produites. Sa glycosylation permet d'éviter une telle activité du stéviol. Les deux groupements fonctionnels du stéviol, le groupement carboxyl en position C-19 et le groupement hydroxyl en position C-13, fournissent des points d'attache aux molécules de *β*-

glucose (Glc), *α*-rhamnose (Rhm) ou *β*-xylose (Xyl), qui se greffent au stéviol pour former les différents SVglys (Shibata *et al.*, 1991 ; Brandle *et al.*, 2002).

C'est par l'observation des corrélations entre les SVglys que les différentes étapes de la synthèse des SVglys à partir du stéviol ont pu être établies : le ST et le RA sont par exemple négativement corrélés. Le ST est en effet le substrat pour la synthèse du RA. Sa diminution correspond donc à une augmentation de la teneur en RA (Shibata *et al.*, 1991). Il résulte de l'étude de ces corrélations une proposition de glycosylations successives conduisant à la formation du RA : le groupement 13-hydroxyl du SV est glucosylé en premier, donnant lieu au stéviolmonoside (Shibata *et al.*, 1991 ; Richman *et al.*, 2005). Un Glc est ensuite ajouté en position C-2' du 13-O-glucose, formant le stéviolbioside. Le groupement carboxyl du stéviolbioside en position C-4 est alors glucosylé : la molécule obtenue est le stévioside (ST). La glucosylation du 13-O-glucose du ST donne le rébaudioside A (RA) (Shibata *et al.*, 1991) (Figure 8).

La recherche des enzymes catalysant les réactions de glycosylation du stéviol (SV) a démarrée au début des années 1990, avec l'identification de deux enzymes, nommées respectivement Enzyme I et Enzyme II. L'Enzyme I est apparue spécifique au stéviol, alors que l'Enzyme II semblait agir sur le stéviolmonoside, le stéviolbioside et le ST (Shibata *et al.*, 1991 ; Shibata *et al.*, 1995). Dans le courant des années 2000, à partir de 12 UGTs candidates, 3 UGTs ont été identifiées comme catalysant les glucosylations successives du SV conduisant à la formation du RA (Richman *et al.*, 2005) (Figure 8). L'UGT85C2 catalyse la formation du stéviolmonoside à partir du SV. L'UGT catalysant la formation du stéviolbioside à partir du stéviolmonoside n'a pas encore été identifiée, bien qu'une UGT candidate, l'UGT91D2, aie récemment été proposée (Kishore *et al.*, 2011). L'UGT74G1 catalyse la formation du ST à partir du stéviolbioside, et l'UGT76G1 catalyse la formation du RA à partir du ST (Richman *et al.*, 1999).

Bien que le ST et le RA soient les deux SVglys les plus communs, le RA n'est probablement pas le dernier produit de la voie. D'autres glycosylations sont suceptibles de se produire, puisque des SVglys ayant jusqu'à sept groupements glycosyl- sont connus, tel que le rébaudioside O (Ohta *et al.*, 2010).

D'autres SVglys mineurs peuvent être formés à partir du stéviolmonoside ou du stéviolbioside, par l'addition de Glc, Rhm ou Xyl (Brandle *et al.*, 1998 ; Starratt *et al.*, 2002 ; Richman *et al.*, 2005). Des études menées *in vitro* montrent la formation du RB par l'addition

d'un Glc au groupement 13-hydroxyl du stéviolbioside. Cette réaction est catalysée par l'UGT76G1 (Richman *et al.*, 2005). L'UGT74G1 catalyserait ensuite la formation du RA à partir du RB. Ainsi, plusieurs voies conduiraient à la formation du RA. L'addition de Rhm ou de Xyl conduit à la formation du DA, du RC et du RF. Les UGTs permettant la formation de ces SVglys n'ont pas encore été identifiées. Néanmoins, la présence/absence du RC (3 glucoses, 1 rhamnose) est en correspondance systématique avec la présence/absence du RA (4 glucoses). Il a ainsi été suggéré que la même enzyme (UGT76G1) catalyse la formation du RA à partir du ST et la formation du RC à partir du DA (Brandle, 1999) (Figure 9).

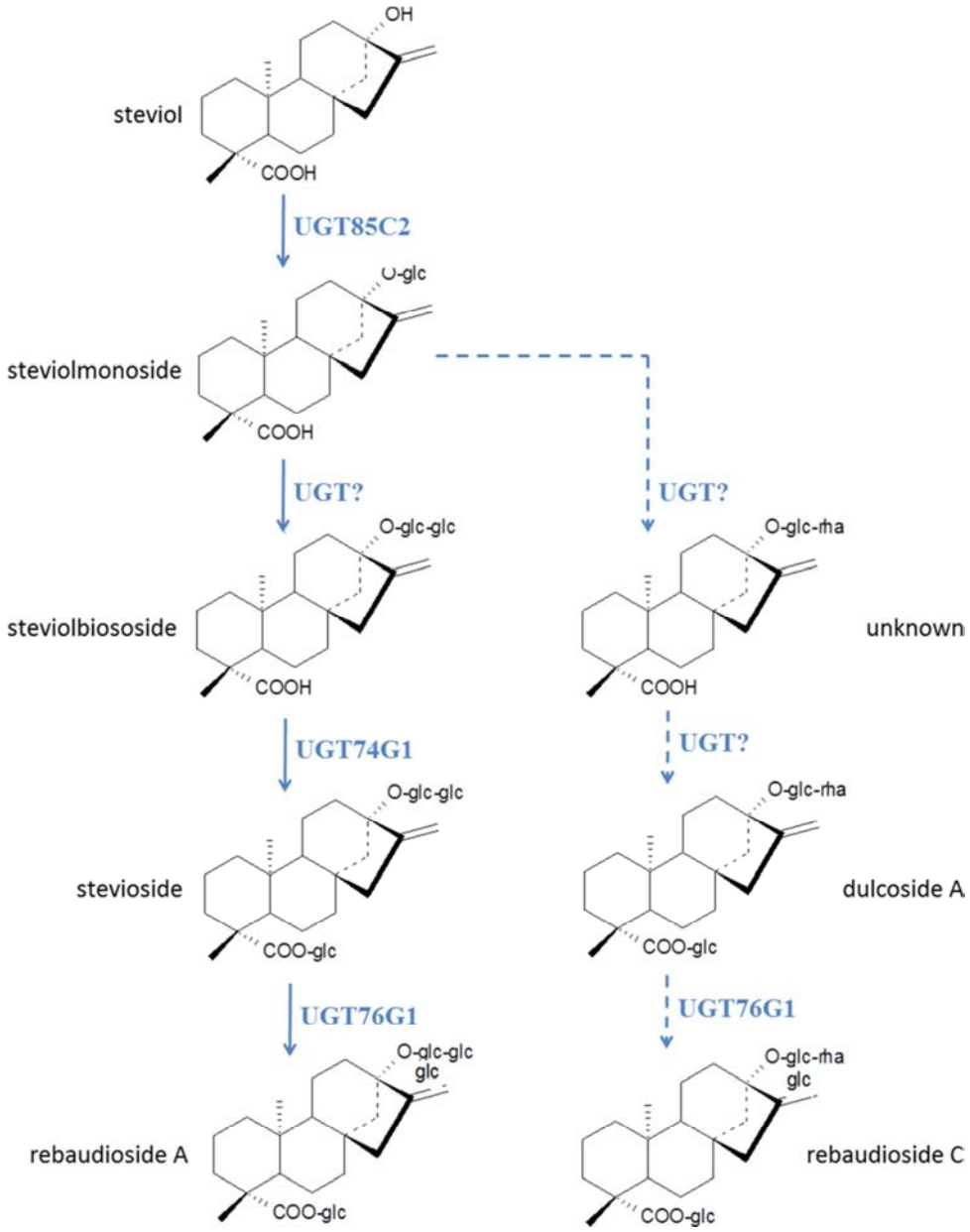


Figure 9: Voie de biosynthèse du stéviol et de ses glycosides conduisant à la formation du RA (flèches pleines) et modèle proposant une voie conduisant à la formation du RC (Brandle, 1999) (flèches en pointillés).
UGTs, UDP-dependant glycosyltransferases.

Dans les plantes, en considérant l'existence de milliers de molécules acceptrices et de seulement une centaine d'UGTs, une multifonctionnalité des UGTs doit exister (Schwab, 2003). Dans le cas de la *S. rebaudiana*, les UGTs identifiées présentent une affinité pour plusieurs substrats : cela suggère que plutôt que de reconnaître la molécule dans sa totalité, elles sont régiospécifiques (Richman *et al.*, 2005). Il est alors proposé que d'autres mécanismes, tels qu'une chaîne métabolique, régulent les multiples réactions de glycosylation (Humphrey *et al.*, 2006). Le rubusoside n'est en effet a priori pas produit *in vivo*, bien qu'il puisse être formé *in vitro* à partir du stéviolmonoside par l'intermédiaire de l'UGT74G1 (Shibata *et al.*, 1995). Il doit donc exister un mécanisme qui empêche l'UGT74G1 d'avoir pour substrat le stéviolmonoside. Il pourrait s'agir du positionnement des différentes glycosyltransférases dans un complexe enzymatique, au niveau du réticulum endoplasmique (Humphrey *et al.*, 2006).

2.2.5. Localisation de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol

L'organisation spatiale de la voie de biosynthèse des SVglys a été étudiée par Humphrey *et al.* (2006). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'enzyme KS est localisée au niveau du chloroplaste (Sun et Kamiya, 1994 ; Helliwell *et al.*, 2001). Il est probable qu'il en soit de même chez *S. rebaudiana*, car cela a été prédit à une probabilité très élevée (0,938) à l'aide du programme de prédiction de localisation cellulaire PSORT (Humphrey *et al.*, 2006). L'enzyme KS conduit à la synthèse du kaurène, qui a une faible polarité et est donc susceptible de traverser les membranes. L'étape suivante de la voie est catalysée par l'enzyme KO. La fusion du gène de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) avec l'enzyme KO a permis de localiser cette enzyme au niveau du réticulum endoplasmique. La similarité de cette enzyme avec d'autres CYP450 suggère en outre qu'elle est incorporée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Le kaurène doit alors passer au travers des membranes, pour aller de son site de synthèse, le stroma des chloroplastes, au réticulum endoplasmique, où il serait accessible à l'enzyme KO. La méthode GFP a également permis de localiser les UGTs 85C2, 74G1 et 76G1 dans le cytosol (Humphrey *et al.*, 2006).

Ainsi, Humphrey *et al.* (2006) ont proposé une organisation spatiale de la voie de biosynthèse des SVglys présentée dans le schéma ci-après (Figure 10). Les étapes de cyclisation de la GGDP pour former le kaurène seraient localisées dans les chloroplastes. Le kaurène formé, il serait transporté vers le réticulum endoplasmique où se situeraient les

enzymes KO et KAH, conduisant à la formation du stéviol. Une fois le stéviol formé, il serait transféré dans le cytosol, où se trouvent les UGTs impliqués dans la synthèse des SVglys. Les SVglys intermédiaires seraient formés dans le cytosol, puis les SVglys finaux (ST et RA) stockés dans la vacuole.

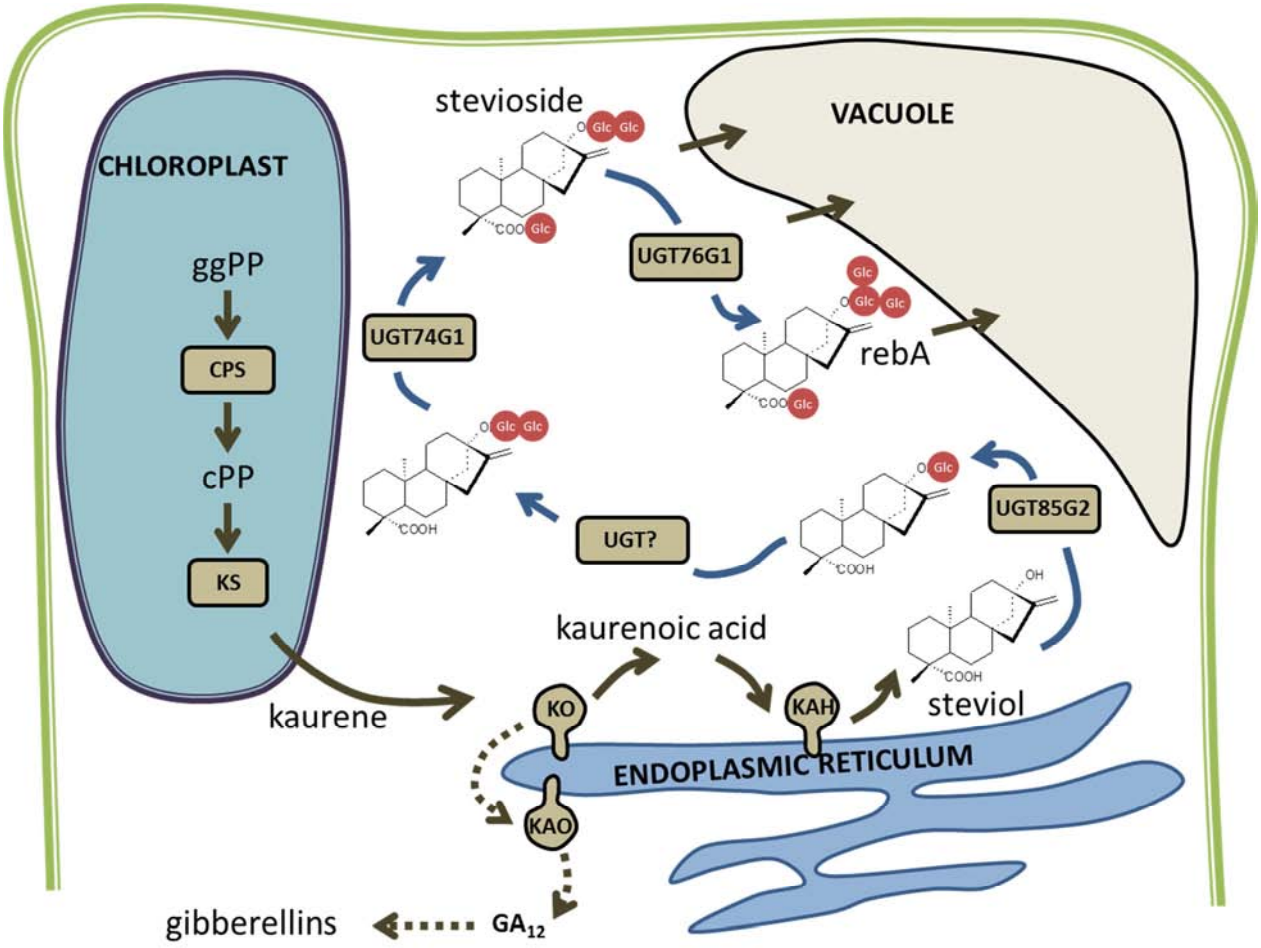


Figure 10: Représentation schématique de l'organisation spatiale de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol, adaptation du graphique de Humphrey *et al.* (2006).
GGPP, geranylgeranyl diphosphate ; CPS, copalyl diphosphate synthase ; KS, kaurene synthase ; KO, kaurene oxidase ; KAO, kaurenoic acid oxydase ; KAH, kaurenoic acid hydroxylase ; UGTs, UDP-dependant glycosyltransferases.

2.3. Enzymes-clés pour la régulation de la voie de biosynthèse des SVglys

Au-delà de la synthèse des SVglys, la voie du MEP prend en charge la synthèse des pigments photosynthétiques (chlorophylles, caroténoïdes) et d'hormones (gibbérellines, acide abscissique) (Cordoba *et al.*, 2011) (Figure 6). Les SVglys sont accumulés à des concentrations élevées dans les feuilles de *S. rebaudiana*. Leur voie de biosynthèse doit donc nécessiter une quantité importante de substrats et d'enzymes et pourrait être en concurrence avec la synthèse d'isoprénoïdes clés, favorisant la croissance de la plante, telles que les gibbérellines ou les chlorophylles (Guleria *et al.*, 2014). La régulation de la voie de biosynthèse des SVglys doit dépendre de l'importance du flux métabolique à l'entrée de la voie du MEP et de sa répartition au sein des différentes voies finales (chlorophylles, gibbérellines, SVglys, etc.) (Figure 11). Plusieurs études ont été menées pour identifier les enzymes clés dans la régulation de la voie de biosynthèse des SVglys.

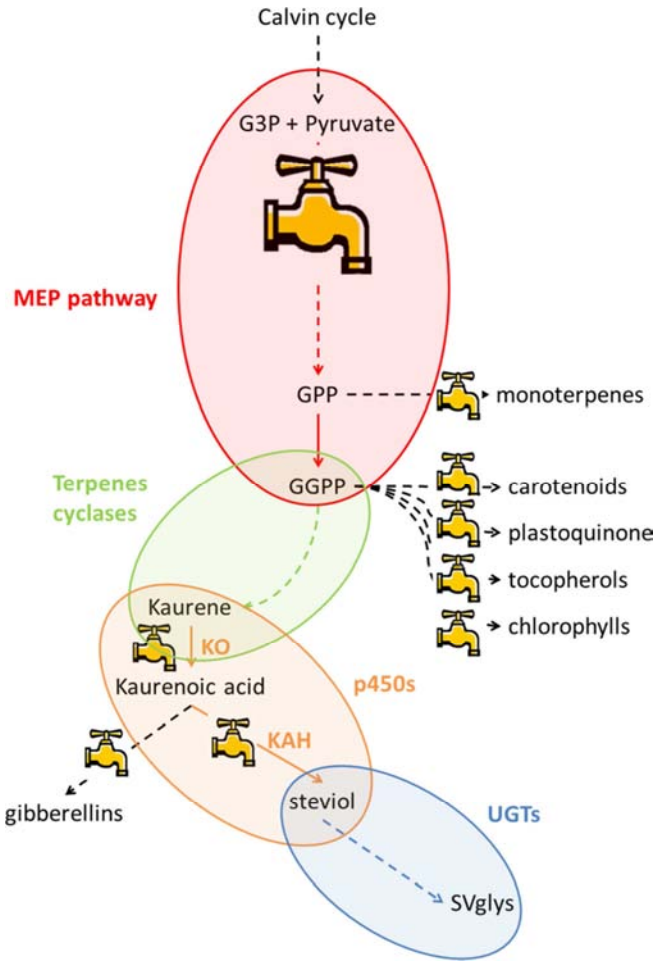


Figure 11: Représentation schématique des étapes de la voie du MEP jusqu'à la formation des SVglys pouvant avoir un rôle clé pour la régulation de l'accumulation en SVglys.
G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; GPP, Geranyl diphosphate; GGPP, geranylgeranyl diphosphate; KO, kaurene oxidase; KAH, kaurenoic acid hydroxylase; UGTs, UDP-dependant glycosyltransferases.

2.3.1. Enzymes communes aux gibbérellines et au stéviol

Au cours des dernières années, des études ont montré l'importance de la photosynthèse, comme source de carbone, dans la régulation de la voie du MEP (Hemmerlin, 2013 ; Banerjee et Sharkey, 2014). Récemment, il a été montré chez *A. thaliana* que l'activité de l'enzyme HDR, enzyme clé dans la voie du MEP, ne dépendait pas seulement du flux de carbone issu de la photosynthèse, mais aussi d'un système de détection du NO_3^- (Ward *et al.*, 2011). Ainsi une régulation complexe de la voie du MEP et de ses produits pourrait avoir lieu selon le statut azoté et carboné des feuilles.

Des études ont indiqué l'importance d'enzymes agissant avant la formation du SV, à savoir CPS, KS et KO, dans la régulation de la teneur en SVglys (Richman *et al.*, 1999 ; Richman *et al.*, 2005 ; Humphrey *et al.*, 2006). Par ailleurs, une corrélation entre le gène codant pour l'enzyme DXR et les teneurs en ST (0,71) et en RA (0,77), ainsi qu'une corrélation entre le gène codant pour KO et la teneur en ST (0,62) ont été observées (Kumar H. *et al.*, 2012a). Ces résultats suggèrent le rôle de ces deux gènes dans le contrôle du flux métabolique pour la synthèse des SVglys. L'enzyme DXR est connue pour jouer un rôle clé dans la régulation de l'accumulation d'isoprénoïdes dans des plantes telles que *Picrorhiza kurrooa* (Kawoosa *et al.*, 2010) ou *Mentha piperita* (Mahmoud et Croteau, 2001). Aucune corrélation n'a été observée pour l'ensemble des autres gènes étudiés (*SrDXS*, *SrMCT*, *SrCMK*, *SrMDS*, *SrHDS*, *SrHDR*, *SrIDI*, *SrGGDPS*, *SrCPS*, *SrKS*, *SrUGT85C2*, *SrUGT74G1* et *SrUGT76G1*), suggérant qu'ils sont non-limitants ou ne régulent pas la voie de biosynthèse des SVglys (Kumar H. *et al.*, 2012a).

2.3.2. Enzymes spécifiques aux glycosides de stéviol

L'étape à partir de laquelle la voie de biosynthèse des SVglys diverge de celle des gibbérellines est l'hydroxylation de l'acide kaurénoïque par l'enzyme KAH pour former le stéviol. Cette enzyme doit donc être d'importance pour la régulation de la voie de biosynthèse des SVglys (Humphrey *et al.*, 2006). Les résultats d'une autre étude suggèrent que l'UGT85C2, qui catalyse la formation du stéviolmonoside à partir du stéviol, pourrait également être une étape limitante pour la synthèse des SVglys (Mohamed *et al.*, 2011).

Les répressions des gènes *SrKAH* et *SrUGT85C2* par silençage génique (*Agrobacterium mediated transient gene silencing*) ont bloqué le flux métabolique vers la voie de biosynthèse des SVglys et l'ont redirigé vers la voie de biosynthèse des gibbérellines (Guleria et Yadav, 2013). Par ailleurs, la surexpression du gène *SrUGT85C2* dans des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* a entraîné une diminution de la teneur en gibbérellines et en chlorophylles dans ces plantes (Guleria *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que la voie des SVglys pourrait être en compétition avec celle des chlorophylles et des gibbérellines, et que l'activité des enzymes KAH et UGT85C2 serait déterminante dans la régulation du flux métabolique issu de la voie du MEP vers les différents produits finaux.

2.3.3. Régulation de la composition en glycosides de stéviol

Les étapes ultérieures de la voie de biosynthèse des SVglys, catalysées par les UGTs et déterminant la composition en SVglys, pourraient être contrôlées par des signaux principalement régulés par le génotype. Des plantes de deux ans ont vu leur teneur totale en SVglys évoluer avec l'âge de la plante, alors que leur composition est restée stable (Brandle, 1999). Une étude menée sur des conifères a montré que la teneur totale en monoterpènes variait selon l'environnement, alors que les proportions individuelles des différents monoterpènes restaient stables (Shaw *et al.*, 1982). Il a alors été suggéré que l'environnement ait un effet marqué sur la teneur totale en SVglys, mais un effet plus faible sur la composition (proportion individuelle des différents SVglys) (Brandle, 1999).

3. ROLE DES GLYCOSIDES DE STEVIOL DANS LA PLANTE

Les SVglys peuvent représenter jusqu'à 20% de la masse sèche des feuilles de *S. rebaudiana*. Une grande fraction de l'activité métabolique de la plante est donc dédiée à leur synthèse. Leur rôle pour la plante n'a néanmoins pas encore été identifié et fait toujours débat aujourd'hui. Certains auteurs défendent l'hypothèse selon laquelle l'évolution ne conserve pas que les molécules conférant un avantage adaptatif aux espèces, mais favorise les espèces qui génèrent et stockent la plus grande diversité de molécules au moindre coût (Firn et Jones, 2000, 2003). Selon cette hypothèse, les SVglys n'ont pas forcément de rôle adaptatif, mais peuvent être issus d'une diversité chimique non sélectionnée à l'origine, qui a contribué au fitness de la plante. L'attrait de l'homme pour le sucre aurait alors aidé à la propagation de *S. rebaudiana*, comme un agent sucrant (Brandle et Telmer, 2007). D'autres hypothèses, conférant une fonction physiologique aux SVglys, ont été formulées. Ces hypothèses coïncident avec celle selon laquelle les métabolites secondaires, compte-tenu de l'énergie déployée pour leur synthèse et leur stockage, sont des caractères adaptatifs, jouant un rôle de défense ou de signal, qui ont été sujet à la sélection naturelle au cours de l'évolution (Williams *et al.*, 1989 ; Wink, 2003).

3.1. Le stéviol, précurseur de gibbérellines

Les voies de biosynthèse proches des gibbérellines et du SV (cf. chapitre 2, § *2.2*) et la similarité de leurs structures chimiques ont conduit dès les années 1960 à l'hypothèse selon laquelle le SV aurait une *gibberellin-like* activité (Ruddat *et al.*, 1963). Dès lors, de nombreuses expériences ont été réalisées afin de déterminer l'activité biologique du SV. Elles sont détaillées dans la revue de Ceneun et Geuns (2013a). Les résultats de ces expériences sont contradictoires et suggèrent que l'activité biologique du SV dépend du type d'essai, du cultivar utilisé, de l'intensité lumineuse et de la concentration appliquée (Ceunen et Geuns, 2013a). La plupart des expériences montrent que le SV nécessite d'être converti en une *gibberellin-like* substance pour devenir actif, ce qui suggère qu'il pourrait agir comme un précurseur plutôt que comme un analogue des gibbérellines. La seule gibbérelline identifiée chez *S. rebaudiana* à ce jour est la GA_{20}, présente à des concentrations de 1.2 $\mu g.kg^{-1}$ de masse fraîche (Alves et Ruddat, 1979). La GA_{20} est hydroxylée en position C-13, comme le

SV. Si cela n'avait pas été le cas, il aurait été peu probable que le SV puisse en être précurseur, car cela aurait impliqué sa déshydroxylation (Alves, 1975, cité par Ceunen et Geuns, 2013a).

Compte-tenu de la faible teneur en GA_{20} dans les feuilles de *S. rebaudiana* comparée à la teneur en SVglys (plus de 10 000 fois moins), si le SV est un précurseur de la GA_{20}, seule une faible fraction de son pool est déployée vers cette voie (Ceunen et Geuns, 2013a). La conversion directe du SV en gibbérelline chez *S. rebaudiana* n'a pas pu être observée (Alves, 1975, cité par Ceunen et Geuns, 2013a). Par ailleurs, des essais ont montré que l'application exogène de SV n'avait pas d'effet sur l'élongation des tiges ou sur l'induction parthénocarpique des graines, contrairement à une application d'acide gibbérellique (Valio et Rocha, 1976). Le SV libre est présent en très faible quantité dans la plante (0,3 à 30 $\mu g.g^{-1}$ matière sèche), ce qui suggère qu'il est continuellement et rapidement glycosylé (Ceunen et Geuns, 2013d). On peut présumer que la glycosylation rapide du SV en SVglys inactive ses propriétés biologiques et l'empêche ainsi d'avoir une influence marquée sur la voie des gibbérelines. Compte-tenu des quantités importantes de SV produites par la plante, son orientation vers la voie des gibbérellines serait nuisible à la plante.

3.2. Une réserve d'énergie

Les plantes vasculaires utilisent généralement l'amidon comme réserve d'énergie. D'autres composés peuvent être utilisés, tels que les huiles et lipides accumulés dans les graines. Chez *S. rebaudiana*, les SVglys, accumulés en quantité importante dans la vacuole, pourraient jouer un rôle de réserve d'énergie. Leur teneur est plus élevée dans les feuilles en développement que dans les feuilles pleinement développées que dans les feuilles sénescentes (Bondarev *et al.*, 2003 ; De Guzman, 2010). Deux hypothèses peuvent alors être émises : (i) les SVglys sont principalement synthétisés dans les feuilles en développement, ils sont stockés dans les feuilles développées et un phénomène de leaching (perte) a lieu dans les feuilles sénescentes. Selon cette hypothèse, les SVglys ont un faible turnover et n'ont donc pas un rôle de réserve d'énergie à court terme ; (ii) la synthèse des SVglys est contrebalancée par un phénomène de catabolisme dans les feuilles développées et ce catabolisme excède la synthèse en SVglys dans les feuilles sénescentes. Il s'agirait alors d'une réserve d'énergie à court terme (De Guzman, 2010).

Une expérience de marquage au $^{14}CO_2$ (De Guzman, 2010) a montré un faible turnover des SVglys dans les feuilles en développement et dans les feuilles pleinement développées, ce qui suggère que les SVglys n'ont pas une fonction de réserve d'énergie à court terme. Au cours d'une autre expérience où les plantes étaient exposées à un environnement enrichi en CO_2, la teneur en SVglys est restée constante alors que la teneur en amidon a augmenté de 50% (De Guzman, 2010). De même, des prélèvements réalisés la nuit ont montré une diminution de la teneur en amidon (de 3,3 à 0,7% w/w) alors que la teneur en SVglys est restée constante (De Guzman, 2010). L'étude de Ceunen et Geuns (2013b) a montré des fluctuations importantes de la teneur en glucose et saccharose lors de prélèvements réalisés la nuit, alors qu'encore la teneur en SVglys est restée régulière. Si les SVglys n'ont pas une fonction de réserve d'énergie sur le court terme, ils peuvent néanmoins avoir un rôle de réserve sur le long terme, pour alimenter les besoins en énergie pendant la floraison et la maturation des graines (Ceunen et Geuns, 2013a).

3.3. Des osmolytes

En situation de stress hydrique, les cellules végétales peuvent maintenir leur turgescence en augmentant leur potentiel hydrique, par l'accumulation de solutés organiques tels que des sucres, des polyols, des acides aminés et leurs dérivés, etc. Ces solutés organiques sont collectivement appelés solutés compatibles ou osmolytes. Ils peuvent s'accumuler à des concentrations élevées dans les cellules, sans nuire à la fonction cellulaire. Ils fonctionnent en partie par action de masse pour restaurer le potentiel osmotique du cytoplasme, ce qui conduit à l'absorption d'eau par la cellule et maintient sa turgescence (Cushman, 2001). Dans une même feuille des solutés de différente nature peuvent être accumulés, ce qui permet d'éviter l'augmentation seule d'un composé individuel. Dans les feuilles de sorgho, par exemple, une augmentation globale des sucres totaux est responsable de 29% de la variation globale du potentiel osmotique (-0,49 MPa) des feuilles stressées. Le reste de l'ajustement osmotique a été attribué à une augmentation des ions inorganiques, au carboxylate de potassium, à l'ensemble des acides aminés libres et aux phosphates de sucre (Jones *et al.*, 1980).

Selon l'étude de Shock (1982), *S. rebaudiana* présente une faible tolérance au stress hydrique. Dans son habitat naturel, cette plante pousse dans des sols aux nappes phréatiques peu profondes, continuellement humides mais n'étant pas sujet à une inondation prolongée. *S.*

rebaudiana ne possède pas de caractéristiques morphologiques xérophiles, telles que des feuilles ou une cuticule épaisses, indiquant que toute adaptation morphologique est limitée à un stress hydrique léger (De Guzman, 2010). Peu d'informations sont disponibles sur le rôle potentiel des SVglys comme osmolytes. Pour une feuille contenant 10% de SVglys (en masse sèche des feuilles), leur contribution théorique au potentiel hydrique serait de -0,703 MPa (Ceunen et Geuns, 2013a). Pour qu'ils aient un rôle d'osmolytes, des fluctuations notables de leur teneur devraient être observées. Or, aucune variation significative de la teneur en SVglys dans les feuilles n'a été observée sur des plantes conduites sous stress hydrique, alors que le potentiel hydrique des feuilles a triplé sa valeur (-3 MPa) (De Guzman, 2010). Ces résultats suggèrent une contribution mineure des SVglys à l'osmorégulation.

3.4. Des pièges à espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) se forment dans les cellules à la suite de nombreux processus, stress biotiques ou abiotiques, déséquilibres rédox, interventions ou synthèses d'hormones, développement, mort cellulaire programmée, etc. Une caractéristique commune aux différentes ROS est leur capacité à causer des dommages oxydatifs aux protéines, à l'ADN ou aux lipides. Leur concentration et leur influence sur le métabolisme cellulaire est régulée par des mécanismes de détoxification enzymatiques (superoxyde dismutase, peroxidases, catalases) et non enzymatiques des plantes (Apel et Hirt, 2004). De nombreux composés non enzymatiques sont connus comme étant des pièges à ROS. Chez *S. rebaudiana*, l'acide folique, le pyrogallol, des flavonoïdes et des composés phénoliques ont une activité de piégeage des ROS (Il-Suk *et al.*, 2011). Les SVglys sont également connus pour être de puissants pièges à ROS (Geuns et Struyf, 2010 ; Stoyanova *et al.*, 2011 ; Hajihashemi et Geuns, 2013).

Le passage de jours longs à jours courts peut être à l'origine d'un stress pour la plante, et il peut en résulter une augmentation de la teneur en espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Gibon *et al.*, 2009). Par ailleurs, la teneur en ROS est transitoirement augmentée lors du passage du stade végétatif au stade reproductif (Zimmermann *et al.*, 2006), ce qui entraine généralement une augmentation de la teneur en antioxydants dans la plante (Lokhande *et al.*, 2003). Chez *S. rebaudiana*, la floraison est induite par les jours courts. Une augmentation de

l'activité de la peroxydase a été mesurée chez les plantes induites en floraison (Modi *et al.*, 2011). La teneur maximale en SVglys est atteinte au stade bouton floral et décline ensuite. L'augmentation de la teneur en SVglys jusqu'au stade bouton floral pourrait être une réaction de la plante pour augmenter son pouvoir anti-oxydant (Mohamed *et al.*, 2011). La diminution de la teneur en SVglys qui a lieu ensuite pourrait être due à leur dégradation oxydative par les ROS (Ceunen et Geuns, 2013a).

3.5. En défense contre les ravageurs

Les terpénoïdes jouent un rôle important de défense contre les ravageurs, en raison de leur action anti-appétante ou toxique (Bennett et Wallsgrove, 1994). Chez le citronnier par exemple, le limonène a des propriétés répulsives contre la fourmi *Atta cephalotes* (Cherrett, 1972). Metivier et Viana (1979) ont été les premiers à proposer un tel rôle pour les SVglys, avec une expérience probante sur le coléoptère *Epicanta adomaria*. Les propriétés de dissuasion des SVglys ont également été testées sur le puceron *Schizaphis graminum* (Nanayakkara *et al.*, 1987). Plus récemment, l'action anti-appétante des SVglys a été à nouveau révélée pour la sauterelle *Valanga irregularis* (De Guzman, 2010). Néanmoins, les résultats n'ont pas été significatifs contre l'araignée rouge *Tetranychus urticae* (De Guzman, 2010). Les propriétés de dissuasion des SVglys n'ont pas eu d'effet sur les larves du papillon *Heliothis virescens* Fabr., ni sur le moustique *Aedes aegypti* L (étude non publiée de Klocke, citée par Nanayakkara *et al.*, 1987). Par ailleurs, des insectes de l'espèce *Pseudoplusia includens* et des genres *Spodoptera* et *Schistocerca* ont été identifiés sur le terrain comme se nourrissant de *S. rebaudiana* (Fuente, 2001). Il pourrait, au final, s'agir de propriétés insecte-spécifiques (De Guzman, 2010).

Soejarto (2002) a observé une faible présence de *S. rebaudiana* dans son habitat d'origine et a suggéré que la plante ait été anéantie par le pâturage du bétail, ce qui indiquerait que *S. rebaudiana* est appréciée des mammifères herbivores. Par ailleurs, la prise alimentaire de cochons d'Inde cobayes a été améliorée lorsque leurs aliments étaient composés à 10% de feuilles de *S. rebaudiana* (De Guzman, 2010). Il a également été montré que le stévioside présentait de forts attraits pour les animaux aquatiques (Miyasaki et Harada, 2003). Le rôle des SVglys en défense contre les ravageurs est donc à considérer avec réserve.

4. VARIABILITE DE LA TENEUR ET DE LA COMPOSITION EN GLYCOSIDES DE STEVIOL DANS LES FEUILLES

4.1. Effet du génotype

Les SVglys diffèrent essentiellement pas le nombre d'unités de sucre liées au stéviol, allant généralement de un à quatre. Les unités de sucre sont principalement du Glc, et dans un moindre mesure du Rhm, du Xyl et du Fru (Figure 12). Les deux principaux SVglys sont le ST (3 Glc) et le RA (4 Glc). Les autres glycosides, dits « mineurs » sont généralement présents en quantité moindre dans les feuilles. Parmi ces derniers, les mieux connus sont le DA et le RC. Les glycosides DA et RC ont les même nombre d'unités de sucre liées au SV que le ST et le RA respectivement, mais de nature différente (un Rhm au lieu d'un Glc en position C-2' du 13-O-glucose) (Figure 12). Ces quatre SVglys (ST, RA, DA et RC) représentent plus de 95% des SVglys trouvés dans les feuilles de *S. rebaudiana*. Les proportions typiques trouvées dans des populations non-améliorées de *S. rebaudiana* sont 2,1% DA, 4,3% RC, 27,5% RA et 65,9% ST (Brandle, 1999).

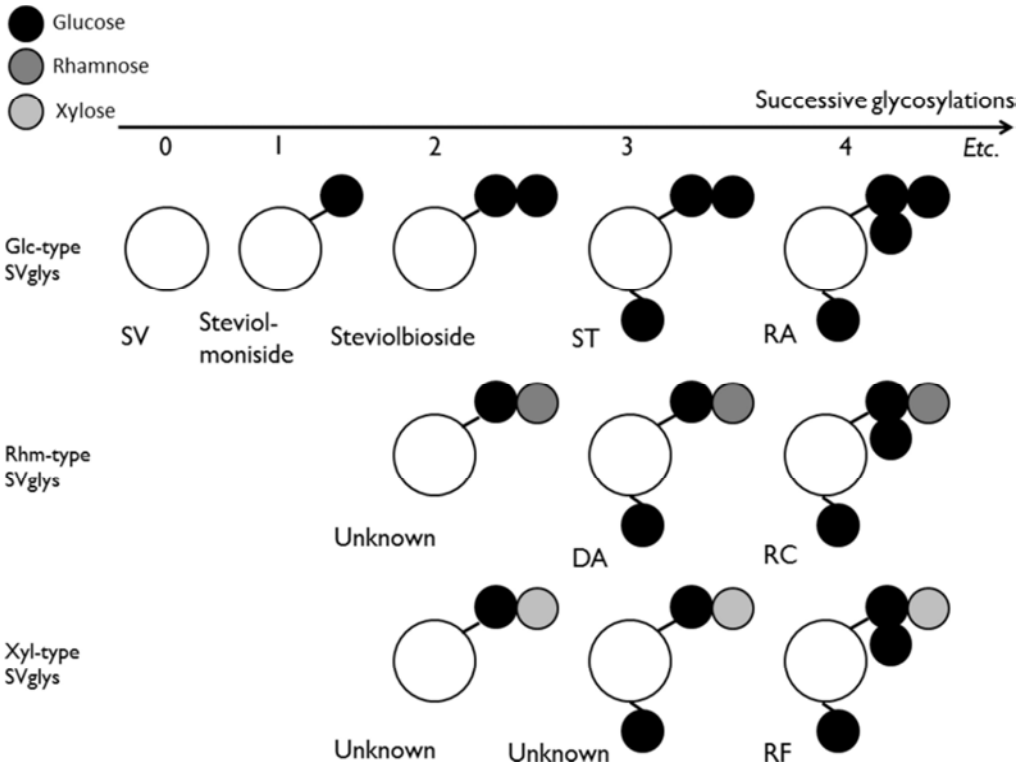


Figure 12: Représentation schématique des principaux glycosides de stéviol.
SV, stéviol; ST, stévioside ; RA, rébaudioside A ; DA, dulcoside A ; RC, rébaudioside C ; RF, rébaudioside F.

Il est bien établi que la teneur en SVglys dans les feuilles de *S. rebaudiana* varie largement selon le génotype (Nakamura et Tamura, 1985 ; Tateo *et al.*, 1998 ; Gaurav *et al.*, 2008 ; Raji Akintunde et Mohamad, 2011). Le contrôle génotypique de la composition en SVglys est néanmoins peu connu.

Dans une population non améliorée de *S. rebaudiana*, les plantes ont été regroupées en trois catégories : i) les plantes contenant principalement des SVglys de type Glc (ST et RA), ii) les plantes contenant principalement des SVglys de type Rhm (DA et RC) et iii) les plantes contenant des quantités équivalentes ou presque de SVglys de type Glc et de SVglys de type Rhm (Nakamura et Tamura, 1985).

Certaines plantes contiennent peu ou pas de RA. Dans ces plantes, des modifications majeures de l'UGT76G1 ont été observées : i) une mutation non-sens hétérozygote a été identifiée. Le séquençage du gène a montré une substitution de T par G en position 389, ce qui conduit à un codon-stop en lieu d'une leucine (p.L121X), induisant ainsi une protéine prématurée (Yang *et al.*, 2014) ; ii) des substitutions d'acides aminés ont eu lieu au niveau du motif PSPG (*Plant Secondary Product Glycosyltransferase*) à l'extrémité C-terminale: (alanine → acide aspartique en position 376, alanine → glycine en position 378 et phénylalanine → leucine en position 379), pouvant potentiellement provoquer la perte de son activité catalytique (Yang *et al.*, 2014). Une étude chez la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) a montré que la substitution d'un seul acide aminé au niveau du motif PSPG de la CaUGT2 entraînait la perte totale de son activité catalytique (Masada *et al.*, 2007). Si le motif PSPG fait partie du site de liaison du sucre activé (Madhav *et al.*, 2013), sa modification peut provoquer un manque de fonctionnalité de l'enzyme (Yang *et al.*, 2014) ; iii) des substitutions d'acides aminés ont conduit à une modification des structures secondaire et tertiaire de la protéine, ce qui a peut-être modifié la fonctionnalité de l'UGT76G1 par rapport à celle présente dans les plantes contenant du RA (Yang *et al.*, 2014). Chez ces dernières, la proportion de RA est très variable. Il a été suggéré que la présence ou absence du RA ne soit contrôlée que par un seul gène (*i.e. SrUGT76G1*) et que, lorsqu'il est présent, la quantité produite soit contrôlée par de multiples *loci* ou allèles (Brandle, 1999).

Comme mentionné précédemment, il a été observé que la présence ou absence du RC coïncidait systématiquement avec celle du RA. Il a alors été suggéré que ces deux composés, également glycosylés et ne différant que par la nature d'une unité de sucre (Figure 9), soient synthétisés par la même enzyme, l'UGT76G1 (Brandle, 1999).

4.2. Facteurs ontogéniques et environnementaux

L'accumulation en SVglys n'est pas seulement déterminée par le génotype mais peut être aussi largement influencée par des facteurs ontogéniques (stade de développement, âge de la feuille) et environnementaux (photopériode, intensité lumineuse, température, eau, nutriments, etc.). La teneur en SVglys dans les feuilles de *S. rebaudiana* peut ainsi varier entre 4 et 20% de la masse sèche des feuilles selon ses conditions de croissance et stade de récolte (Metivier et Viana, 1979 ; Geuns, 2003).

4.2.1. Stade de développement

Il est généralement admis que la teneur en SVglys dans les feuilles augmente progressivement jusqu'à la formation des bourgeons floraux (Bondarev *et al.*, 2003 ; Ceunen et Geuns, 2013c ; Yang *et al.*, 2015). Dans une étude, la teneur en SVglys (ST, RA, DA et RC) a été mesurée sur 300 plantes individuelles. Au stade plantule, la teneur variait entre 0,5 et 3,7% alors qu'au stade bouton floral elle était comprise entre 6,7 et 18,6%, pour une valeur moyenne de 12,2% (Nakamura et Tamura, 1985). Une fois le stade bouton floral atteint, la teneur en SVglys a ensuite tendance à stagner (Zaidan *et al.*, 1980 ; Ceunen *et al.*, 2011) ou à décroître de 20 % (Mitsuhashi *et al.*, 1975) à 35-50% (Bian, 1981 ; Vanidze *et al.*, 2009 ; Ceunen *et al.*, 2011).

Un effet du stade de développement sur la composition en SVglys a également été observé à l'échelle de la plante, avec un ratio RA/ST supérieur pour les plantes en début de floraison en comparaison à des plantes prélevées à des stades végétatifs (Tavarini et Angelini, 2013).

S. rebaudiana est une plante de jours courts, avec une longueur de jour critique de 12-13h (Brandle *et al.*, 1998). Les jours courts induisent la floraison alors que les jours longs favorisent l'accumulation de biomasse en maintenant la plante à un stade végétatif. Si la teneur en SVglys augmente jusqu'à l'induction florale, des conditions de jours longs devraient permettre d'augmenter la teneur en SVglys dans les feuilles en retardant la floraison. Récemment il a été montré qu'une interruption de la nuit par de la lumière rouge LED (660 nm) pendant cinq minutes en conditions de jours courts (8h) permettait le maintien des plantes à un stade végétatif (Ceunen *et al.*, 2011). Après sept semaines de traitements, les

plantes dont la nuit était interrompue par de la lumière rouge avaient une teneur en SVglys deux fois plus élevée que les plantes maintenues en jours courts uniquement et dont la floraison avait été induite. La teneur en SVglys des plantes conduites en jours longs (16h) n'était quant à elle pas significativement différente de la teneur obtenue pour les plantes conduites avec le traitement à la lumière rouge (Ceunen *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que l'accumulation en SVglys est principalement influencée par le stade de développement, lui-même influencé par la photopériode. L'influence de la lumière rouge sur la teneur en SVglys est un effet indirect de la prolongation de la croissance végétative dans ces conditions (Ceunen *et al.*, 2011).

4.2.2. Photopériode et âge de la feuille

Des expériences ont montré un effet de la photopériode sur l'accumulation en SVglys au-delà de son effet indirect d'induction de la phase reproductive. Dans l'étude de Ceunen et Geuns (2013c), des plantes étaient conduites entièrement en jours courts (8h) ou en jours longs (16h), du stade végétatif à la floraison. A la fin de la période végétative, la teneur était de 30% élevée dans les plantes conduites en jours courts par rapport aux plantes conduites en jours longs. Des résultats similaires ont été obtenus dans l'étude de Mohamed *et al.* (2011). Dans l'étude de Metiver et Viana (1979), en revanche, la teneur en SVglys était presque deux fois plus faible en condition de jours courts qu'en jours longs.

Dans l'étude de Ceunen et Geuns (2013c), un déclin de la teneur en SVglys a été observé pendant la période reproductive sous les deux photopériodes (8h et 16h). En condition de jours longs, ce déclin a été plus marqué pour les feuilles pleinement développées, alors qu'en condition de jours courts, il a eu principalement lieu dans les feuilles en développement.

De manière générale, la teneur en SVglys est plus élevée dans les feuilles en développement que dans les feuilles pleinement développées et sénescentes (De Guzman, 2010 ; Mohamed *et al.*, 2011). La teneur peut y être de 30 à 170% plus élevée selon le génotype (Bondarev *et al.*, 2003). La transcription des gènes *SrUGT85C2*, *SrUGT74G1* et *SrUGT76G1* est également plus élevée dans les feuilles les plus jeunes (Mohamed *et al.*, 2011). L'étude de Kumar H. *et al.* (2012a) révèle également une diminution de l'expression des gènes *SrDXS*, *SrMCK*, *SrHDR*, *SrIDI*, *SrGGDPS* et *SrCPPS* dans les feuilles plus âgées.

Pour les plantes conduites en jours longs, la composition est restée relativement stable, quel que soit l'étage foliaire considéré (Mohamed *et al.*, 2011 ; Ceunen et Geuns, 2013c). Dans l'étude de Mohamed *et al.* (2011), une augmentation du ratio RA/ST dans les jeunes feuilles des plantes conduites en jours courts a été remarquée. Les résultats de Ceunen et Geuns (2013c) montrent quant à eux, pour les plantes conduites en jours courts, un ratio RA/ST plus élevé au stade végétatif, pour l'ensemble des étages foliaires.

4.2.3. Intensité lumineuse et source de carbone

La lumière est une source d'énergie (carbone) pour la plante. Des régimes d'ombre élevés (50%, 75%) ont entraîné une diminution de l'activité photosynthétique de *S. rebaudiana* ainsi qu'une diminution de sa production de biomasse. Néanmoins, aucun effet n'a été observé sur la teneur en SVglys des plantes, ni sur leur composition (ratio RA/ST) (Kumar R. *et al.*, 2012). Dans une autre étude, du saccharose a été utilisé comme source de carbone exogène. La teneur endogène en saccharose des plantes traitées avec 5% de saccharose était plus élevée que celle des plantes traitées avec 1 ou 3% de saccharose. Une augmentation globale de l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des SVglys, codant pour les enzymes CPS, KS, KO, UGT85C2 et UGT76G1, a été observée dans les plantes traitées à 5%. En outre, environ 4.5 fois plus de SVglys ont été accumulés dans les feuilles des plantes traitées à 5% en comparaison aux plantes traitées à 1 ou 3% (Guleria *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que le saccharose pourrait agir comme un activateur de la transcription des gènes de la voie de biosynthèse des SVglys, et aurait un impact positif sur la production des SVglys (Guleria *et al.*, 2011).

L'intensité lumineuse favorise l'activité photosynthétique des plantes et ainsi l'accumulation de sucres (principalement glucose, fructose, saccharose). L'hypothèse selon laquelle la lumière stimulerait la voie du MEP, via l'accumulation de saccharose dans la plante, et ainsi la voie des SVglys, est en accord avec les résultats de Metivier et Viana (1979), qui ont montré une teneur en SVglys jusqu'à deux fois plus élevée dans les plantes conduites en jours longs par rapport aux plantes conduites en jours courts. Des résultats contradictoires ont cependant été obtenus par Mohamed *et al.* (2011) et par Ceunen et Geuns (2013c). Des études récentes ont néanmoins montré un rôle de la lumière dans la régulation de

l'expression des gènes de la voie du MEP chez *S. rebaudiana* (Kumar H. *et al.*, 2012b ; Kumar et Kumar, 2013).

4.2.4. Température

Les conditions optimales pour la croissance de *S. rebaudiana* et la production en stévioside ont été obtenues sous un régime de 25°C (jour) / 20°C (nuit) (Mizukami *et al.*, 1983). La teneur en glycoside de stéviol des plantes était moins élevée sous ce régime que pour des plantes conduites en serre (9,2% *vs.* 10,1%), mais la production de biomasse plus élevée, ce qui a conduit à une augmentation de la production en ST ($g.plante^{-1}$) de 50%. Sous un régime de 15°C / 10°C, la teneur en stévioside et la production de biomasse étaient de 40% et de 60% respectivement moins élevées que sous le régime 25°C / 20°C (Mizukami *et al.*, 1983). La transcription des quinze gènes identifiés de la voie de biosynthèse des SVglys a également été maximale à 25°C, en comparaison à des températures de 35°C et 15°C (Yang *et al.*, 2015). Une diminution évidente de la transcription des gènes *SrDXS*, *SrMCT*, *SrCPPS1* et *SrUGT76G1* a été observée sous des faibles températures (15°C).

4.2.5. Eau et éléments nutritifs

Dans l'étude de Guzman *et al.* (2010), aucune variation significative de la teneur en SVglys dans les feuilles n'a été observée sur des plantes conduites sous stress hydrique. Une autre étude a néanmoins montré une diminution des niveaux de transcription des gènes *SrDXS*, *SrMCT*, *SrCMK*, *SrIDI*, *SrGGDPS*, *SrCPPS1*, *SrUGT85C2*, *SrUGT74G1* et *SrUGT76G1* dans des plantes en situation de stress hydrique (Yang *et al.*, 2015). La transcription du gène *SrDXR* a quant à elle augmenté de 10%. La simulation d'un stress hydrique avec du polyethylene glycol a entraîné une diminution significative des niveaux de transcription des gènes *SrKO*, *SrUGT85C2* et *SrUGT76G1*, alors que les niveaux de transcription des gènes *SrKS1-1*, *SrKAH* et *SrUGT74G1* sont restés assez stables (Hajihashemi *et al.*, 2013).

Peu d'études sont actuellement disponibles sur la façon dont la disponibilité en éléments minéraux affecte la production SVgly dans les plantes (Patil, 2010 ; Aladakatti *et al.*, 2012 ; Pal *et al.*, 2013). L'application d'éléments nutritifs [KNO_3 et $Ca(NO_3)_2$] a conduit à une augmentation de la teneur en chlorophylle, azote et potassium contenus dans les feuilles, mais n'a pas eu d'effet sur la teneur en SVglys (Pal *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces facteurs génotypiques, ontogénétiques et environnementaux ont également un effet sur la production de biomasse. Cela doit être pris en compte pour définir les conditions optimales d'élaboration du rendement en SVglys (g/plante), qui dépend de la production de biomasse foliaire et de la teneur en SVglys des feuilles (% MS).

Chapitre 3 : Objectifs de thèse et moyens mis en œuvre

1. OBJECTIFS DE THESE

La synthèse des résultats des travaux réalisés sur *S. rebaudiana* met en évidence les faibles connaissances agronomiques pour la culture de cette plante en milieu tempéré. La plupart des études agronomiques portent principalement sur l'élaboration de la biomasse et ne tiennent pas compte de la teneur et de la composition en glycosides de stéviol. Par ailleurs, le mode de propagation à préférer (semis ou clones) n'est pas encore arrêté. Des variétés de *S. rebaudiana* ont déjà été obtenues, tant en en vue de sa propagation sexuée qu'asexuée. Les critères de sélection ne sont cependant pas encore établis et peu d'informations sont disponibles sur les interactions génotype x environnement. En vue du développement de la culture de *S. rebaudiana* au sein de l'Union Européenne, et en France plus précisément, il reste à définir des critères de sélection variétale, selon les normes de DHS (Distinction, Homogénéité, Stabilité).

La voie de biosynthèse des glycosides de stéviol a été l'objet de nombreuses études et la voie principale, conduisant à la formation du stévioside et du rébaudioside A, est connue. Les voies parallèles ou annexes, conduisant à la formation d'autres glycosides de stéviol, dits « mineurs », ne sont quant à elles pas encore élucidées. Par ailleurs, si des mécanismes de régulation de la voie sont proposés à l'échelle moléculaire, peu de conclusions sont apportées sur les facteurs génotypiques et environnementaux pouvant réguler cette voie.

Ainsi, le premier objectif de ce travail de recherche (Partie 2) est d'explorer la variabilité intraspécifique, en vue de pouvoir proposer des critères de sélection variétale pour le développement de nouvelles variétés de *S. rebaudiana*. Cela passe par l'exploration de la variabilité génotypique pour la teneur et de la composition en glycosides de stéviol, ainsi que pour des critères morphologiques et de précocité, et par la caractérisation des interactions génotype x environnement les plus influantes sur la productivité des clones. Ce travail permet aussi d'élaborer des hypothèses sur la part génotypique dans le contrôle de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol.

Le deuxième objectif (Partie 3) est de caractériser l'effet de facteurs environnementaux et ontogénétiques clé sur l'élaboration de la biomasse chez *S. rebaudiana* et sur la teneur et la composition en glycosides de stéviol, afin de pouvoir proposer des itinéraires techniques pour sa culture en milieu tempéré. Les facteurs étudiés sont le stade de développement, l'âge de la feuille, la longueur de jour et la fertilisation. L'approche écophysiologique de cette partie permet de comprendre le fonctionnement de la plante pour l'élaboration du rendement : croissance (métabolisme primaire) et accumulation en glycosides de stéviol (métabolisme secondaire).

2. MATERIEL VEGETAL

2.1. Origine du matériel végétal

L'ensemble du travail réalisé au cours de cette thèse a eu lieu en parallèle de la mise en place d'une pépinière de sélection variétale de *S. rebaudiana*. Des graines de multiples origines ont été obtenues : graines issues d'une population de Criola (population native du Paraguay, non-améliorée), d'une population de Morita (plantes sélectionnées au Japon pour leur teneur élevée en RA), d'une population native du Brésil. Des plants issus de ces populations ont été sélectionnés, pour la variabilité de leur port (non-ramifié à buissonnant) et de leur morphologie foliaire (taille, forme et couleur des feuilles). A cela s'ajoute des pieds individuels, d'origine variée : Italie, Paraguay, Brésil. L'ensemble de ces plantes (96 génotypes ; G1-G96) constitue la collection de clones étudiée au cours des travaux de cette thèse.

2.2. Mode de propagation

Afin de pouvoir étudier les effets distincts du génotype et de l'environnement sur l'élaboration du rendement chez *S. rebaudiana* (*i.e.* biomasse foliaire et teneur en SVglys pour les paramètres quantitatifs du rendement ; composition en SVglys pour les paramètres qualitatifs), l'étude de plants individuels a été retenue. Les pieds de *S. rebaudiana* ont donc été reproduits par bouturage.

Les méthodes de bouturage ont été progressivement optimisées. Les jeunes rameaux sont à préférer aux tiges plus âgées et en cours de lignification pour la réalisation des boutures. Deux nœuds par tronçon de tige suffisent pour que la bouture se développe. Le nœud inférieur, planté dans du terreau, permet la formation des racines. L'ajout d'hormones de bouturage facilite l'enracinement. Le nœud supérieur permet quant à lui une reprise de la croissance végétative. Les boutures ont été réalisées dans des plaques de 104 godets (Agri Garonne, France). Le terreau utilisé était un terreau spécial semis et bouturage, composé de tourbe blonde de sphaigne, de tourbe brune de sphaigne et de perlite (50% matière organique ; pH_{eau} = 6 ; engrais 6-7-12 $kg.m^{-3}$; SB2, Proveen substrate, Holland). L'hormone de bouturage comportait 0,25% d'acide béta-indole butyrique (Chryzotop Vert, Bayer Jardin, France).

Avant le développement des racines, les boutures de *S. rebaudiana* sont très sensibles au stress hydrique. Une fois la bouture enracinée, elle est, au contraire, sensible aux excès d'eau. Ainsi, l'emploi de mini serres permet d'obtenir des conditions optimales pour l'enracinement des boutures. Une légère irrigation quotidienne des plants est préférable à une irrigation appuyée, pouvant entraîner une pourriture des racines. Le rempotage des plantes en godet (6 x 6 cm), dans du terreau spécial rempotage (tourbe brune, tourbe blonde et argile ; 50% MO ; pH_{eau} = 6 ; engrais 12-14-24 $kg.m^{-3}$; PAM2, Proveen substrate, Holland) et une fertilisation hebdomadaire (Osmosol 12-7-31 à 1 $g.L^{-1}$; Everris, USA) avant leur transplantation au champ leur permet de bien se développer et de renforcer leur système racinaire (Figure 13).

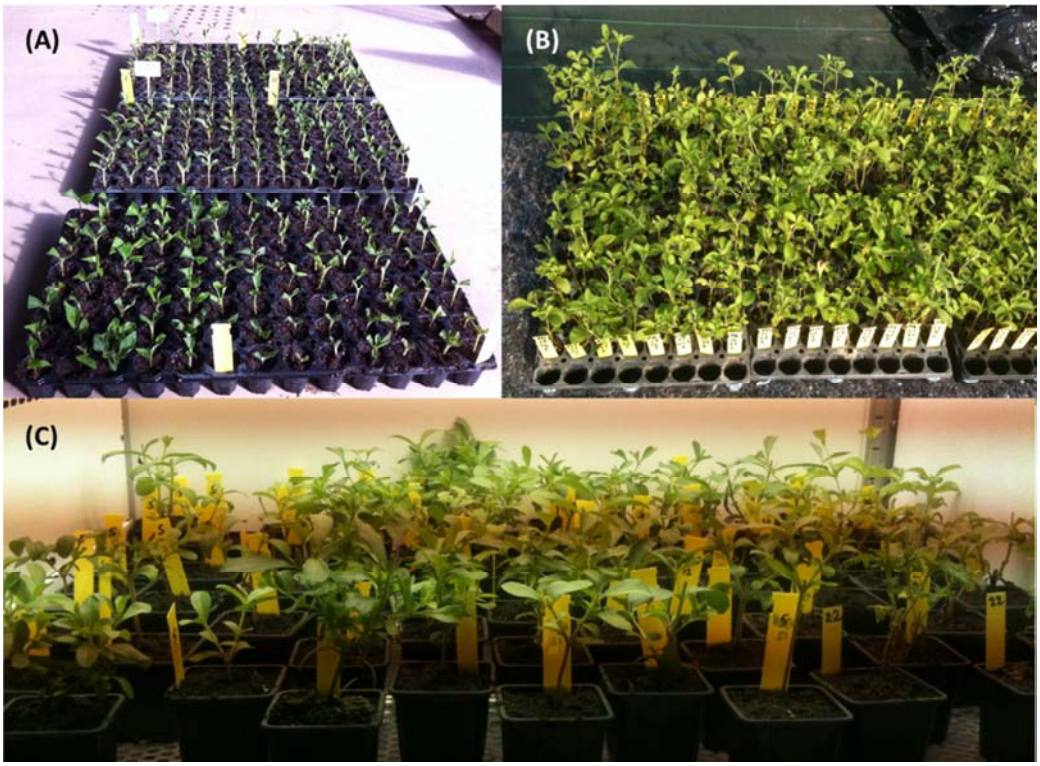


Figure 13: (A) boutures avant enracinement; (B) boutures après enracinement ; (C) boutures rempotées en godet avant transplantation au champ.

Une forte pression de pucerons a été observée sur les pieds de *S. rebaudiana* conservés en serre et chambre de culture. Du savon noir (Solabiol, France) et des larves de coccinelle (Coccilaure ; Biotop, France) ont été utilisés pour lutter contre ces ravageurs. Des mouches du terreau se sont également fortement développées et ont été nuisibles au développement des plantes. Des nématodes (Biotop, France) ont été utilisés pour lutter contre ces ravageurs. Aucun produit phytosanitaire n'a été utilisé, afin de ne pas perturber l'état physiologique des plantes.

Afin d'assurer un bon état sanitaire des plantes, des apports de cuivre (bouillie bordelaise comportant du cuivre de sulfate de cuivre neutralisé à la chaux 20% ; apporté à 2,5mL.L^{-1} ; Bayer Jardin, France) et de soufre (soufre liquide comportant du soufre micronisé à 825 g.L^{-1} ; apporté à 8 mL.L^{-1} d'eau ; Solabiol, France) ont été réalisés ponctuellement sur les jeunes plants en serre. Ces solutions ont un effet préventif contre l'oïdium, le mildiou et autres maladies bactériennes.

Des symptômes foliaires de maladie ont néanmoins parfois été observés (Figure 14). Les agents pathogènes de *S. rebaudiana* n'ont pas été identifiés. Les plantes utilisées pour les expérimentations ne présentaient pas de symptômes de maladie.

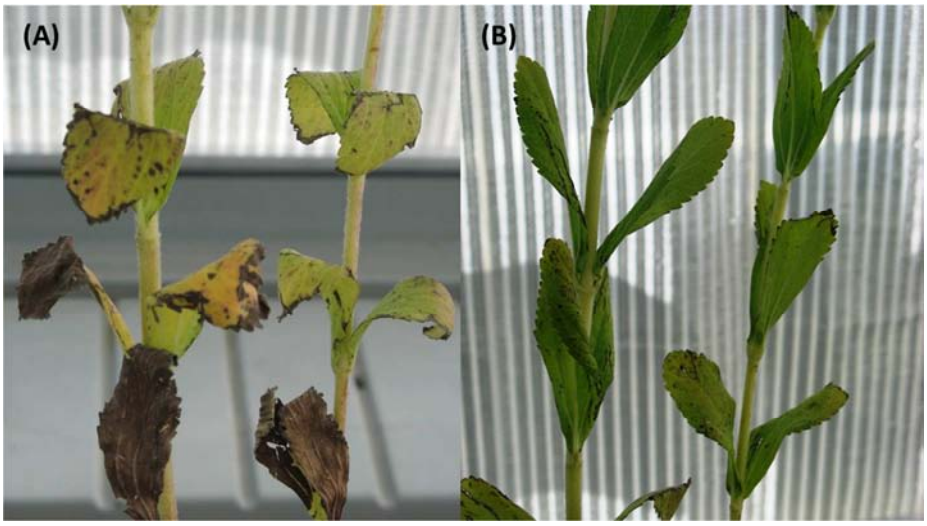


Figure 14: Symptômes foliaires de maladies chez S. rebaudiana. (A) feuilles chlorosées portant des nécroses ; (B) feuilles non chlorosées portant des nécroses.

3. SITES EXPERIMENTAUX

Les expérimentations réalisées au cours de ce travail de thèse ont eu lieu en conditions non contrôlées (champ), en conditions semi-contrôlées (SCC ; serre) et en conditions contrôlées (CC ; chambre de culture).

Les expérimentations en champ ont été réalisées sur 4 sites (Figure 15) : le site I (43 ° 54'N, 1 ° 41'E) et le site II (43 ° 54'N, 1 ° 41'E) correspondent à des parcelles chez deux agriculteurs à Salvagnac (Tarn). Le site III est la pépinière de sélection variétale basée à l'INP-EI Purpan (Toulouse, Haute-Garonne ; 43 ° 36'N, 1 ° 24'E). Le site IV est une parcelle sur la station expérimentale de l'INP-EI Purpan, le domaine de Lamothe (Lamasquère, Haute-Garonne ; 43 ° 29'N, 1 ° 14'E). Les caractéristiques agronomiques de ces parcelles sont présentées dans le Tableau 5.

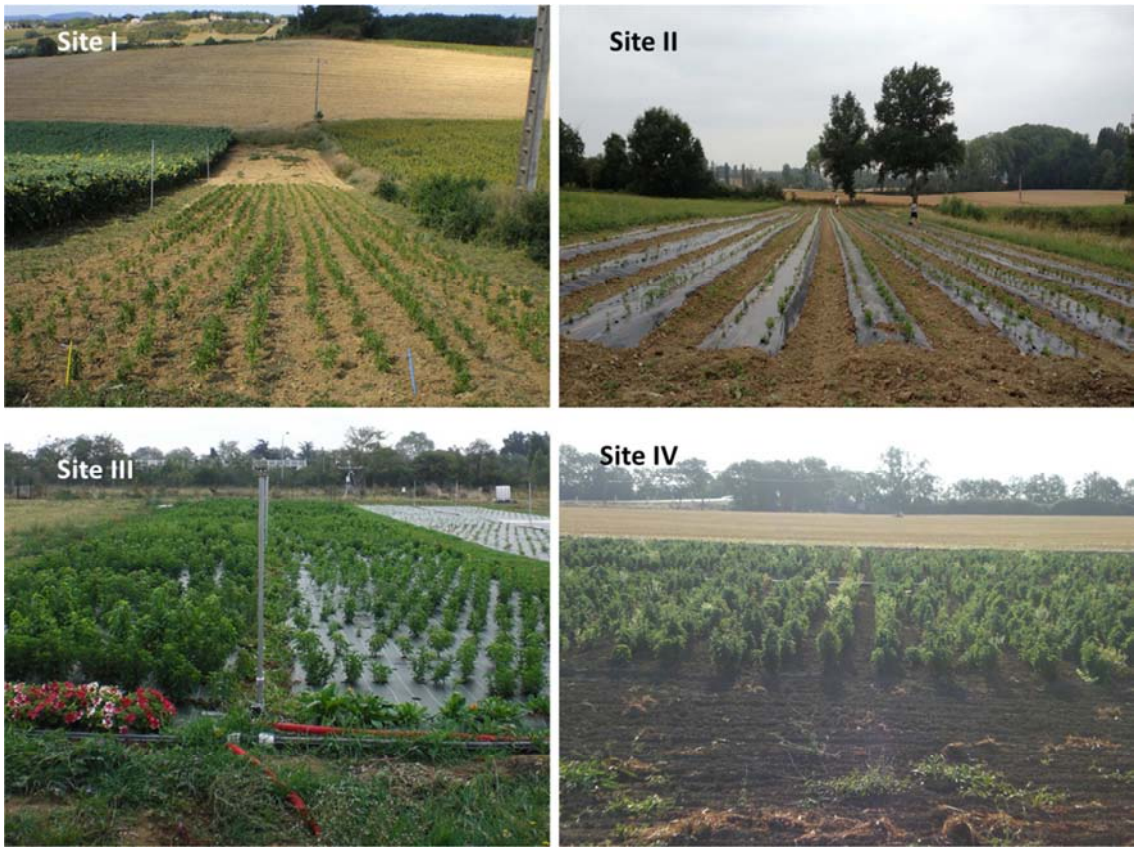


Figure 15: Photographies des quatre parcelles d'essai.

Tableau 5 : Caractéristiques agronomiques des quatre parcelles d'essai pour les expérimentations en champ.

Caractéristiques agronomiques	Site I	Site II	Site III	Site IV
Pente et orientation	5% N	0%	0%	0%
Sables (2-0.05 mm %)	38.9	25.0	35.7	32.6
Limons (0.05-0.002 mm %)	25.8	60.0	47.4	49.2
Argiles (< 0.002 mm %)	35.3	15.0	14.5	16.1
$pH_{(H2O)}$	8.3	6.50	6.9	6.25
Matière organique (%)	1.69	2.50	2.60	2.05

La serre et la chambre de culture (Figure 16) sont basées sur le site de l'INP-EI Purpan (Toulouse, Haute-Garonne ; 43 ° 36'N, 1 ° 24'E). La serre, utilisée pour les expérimentations en conditions semi-contrôlées (SCC), est un tunnel de 250 m^2 avec aérations latérales et ordinateur climatique, permettant de réguler la température et l'humidité.

La chambre de culture, utilisée pour les expérimentations en conditions contrôlées (CC), fait une surface de 24 m^2. Elle est séparée au centre par une cloison. Les lampes et thermostats de part et d'autre de la cloison fonctionnent de manière indépendante, permettant d'avoir des conditions de croissance différentes au cours d'une même expérimentation, portant sur la durée du jour et/ou les températures. L'éclairage est fourni par des lampes à vapeur de sodium sous haute pression (SHP, 200 W) et des lampes aux halogénures (MH, 200 W). Le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, photosynthetically active radiation) est de 400 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ au niveau des plantes. L'humidité relative (RH, relative humidity) est régulée à l'aide d'un capteur d'humidité, ne permettant pas de réguler différemment les deux zones de la chambre de culture.

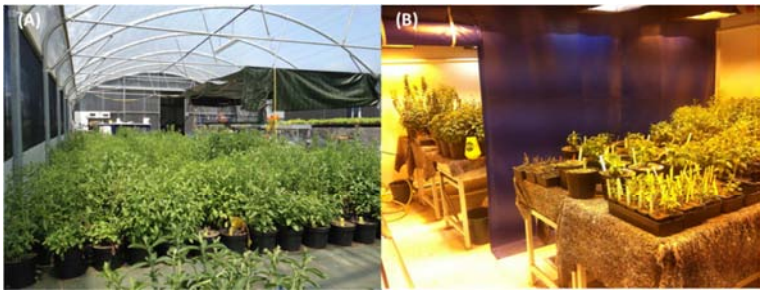


Figure 16: Photographie (A) du tunnel, conditions semi-contrôlées (SCC) ; (B) de la chambre de culture, conditions semi-contrôlées (SCC).

L'exploration de la variabilité intraspécifique et des interactions génotype x environnement (Partie 2) a été réalisée au moyen d'expérimentations en champ. L'effet du génotype sur des critères morphologiques, de précocité et sur la teneur et la composition en glycosides de stéviol (Chapitre 4) a été étudié sur les 96 génotypes de la collection (G1 à G96). L'expérimentation a eu lieu sur les sites III et IV pendant deux ans (2012 et 2013). Les interactions génotype x environnement pour l'élaboration de la biomasse et l'accumulation en glycosides de stéviol (Chapitre 5) ont été étudiées avec trois génotypes : les génotypes A, B et C (précédemment désignés comme G2, G20 et G21 respectivement); au moyen d'un essai multi-local sur les sites I, II, III et IV pendant un an (2014).

L'effet de facteurs environnementaux et ontogénétiques clé sur l'élaboration de la biomasse chez *S. rebaudiana* et sur la teneur et la composition en glycosides de stéviol (Partie 3) a été étudié par des expérimentations en conditions contrôlées (CC ; *i.e.* chambre de culture), en conditions semi-contrôlées (SCC ; *i.e.* serre) et en champ (FC, field conditions). L'effet du stade de développement, de l'âge de la feuille et de la longueur de jour (Chapitre 6) a été étudié au moyen de deux essais en CC, sur le génotype A. L'effet de la fertilisation et de l'intensité lumineuse (Chapitre 7) a été étudié sur les génotypes A et B, en CC, SCC et en FC.

Les plans d'expérience et matériels et méthodes de chacune des expérimentations sont présentées dans chacune des parties de résultats.

PARTIE 2. VARIABILITE GENOTYPIQUE ET INTERACTIONS GENOTYPE-ENVIRONNEMENT

Introduction de la Partie 2

INTRODUCTION DE LA PARTIE 2

L'approbation des SVglys comme additif alimentaire au sein de l'Union européenne en Novembre 2011 a développé le marché des produits de *S. rebaudiana*. Dès lors, les cultures expérimentales se sont multipliées en Europe, visant à montrer la possibilité de cultiver cette plante en milieu tempéré. Au préalable, un travail de sélection variétale est nécessaire, afin d'optimiser l'élaboration du rendement (biomasse foliaire, teneur et composition en SVglys). Des caractères tels que la tolérance ou la résistance des plantes aux maladies, aux intempéries, à la sécheresse ou aux excès d'eau sont aussi à prendre en compte. Par ailleurs, la prise en compte de la précocité des plantes est nécessaire, afin de valoriser l'ensoleillement estival et d'assurer une production de SVglys optimale sous nos latitudes (Andolfi *et al.*, 2006). Une évaluation des plantes sur plusieurs années doit également être réalisée, en vue d'une culture pluriannuelle de *S. rebaudiana*.

En France, l'évaluation variétale est réalisée dans le but de s'assurer de la stabilité et de l'intérêt d'une nouvelle variété. Elle évalue les lignées notamment sur des critères de distinction, d'homogénéité et de stabilité (épreuve DHS). Ainsi, il est indispensable d'identifier des caractères adaptés à la description de l'espèce, afin de pouvoir comparer de manière précise et robuste les génotypes entre eux et développer des nouvelles variétés de *S. rebaudiana*.

L'objectif de cette partie est d'explorer la variabilité génotypique sur la teneur et composition en SVglys et sur divers critères morpho-physiologiques (chapitre 4) et de caractériser l'effet des interactions génotype x environnement (chapitre 5), en vue d'un travail de sélection et d'évaluation variétale.

Le chapitre 4 est divisé en deux sections. La première correspond à des résultats valorisés sous forme d'une publication scientifique : « Towards a semi-perennial culture of *Stevia rebaudiana* under temperate climate: effects of genotype, environment and plant age on steviol glycoside content and composition » Claire Barbet-Massin, Simon Giuliano, Lionel Alletto, Jean Daydé and Monique Berger ; *Genetic Resources and Crop Evolution* 2015, Online First, DOI: 10.1007/s10722-015-0276-9. Cette section a pour objet d'évaluer la variabilité génotypique de la teneur et de la composition en SVglys au sein d'une collection de génotypes de *S. rebaudiana*. L'effet de l'environnement a également été caractérisé, par

l'étude de cinq de ces génotypes sur deux sites d'expérimentation. L'adaptation de ces plantes à un système de culture semi-pérenne en milieu tempéré a été évaluée par le biais de la survie des plantes à l'hiver et par l'évolution de l'accumulation en SVglys dans les plantes de deux ans. La deuxième section du chapitre 4 porte sur la variabilité génotypique de divers caractères morpho-physiologiques (morphologie des feuilles, port des plantes, précocité, sensibilité aux maladies), dans le but d'identifier des caractères phénotypiques adaptés à la description de l'espèce.

L'objectif du chapitre 5 est d'évaluer les interactions génotype x environnement chez *S. rebaudiana* pour sa culture et l'élaboration de son rendement en milieu tempéré. Trois génotypes, aux caractéristiques morphologiques, de précocité et de teneur et composition en SVglys variables, ont été étudiés sur quatre sites pendant un an. Des prélèvements à plusieurs stades de développement ont été réalisés afin de déterminer l'optimum de récolte pour ces trois génotypes aux précocités différentes.

Chapitre 4. Effets génotypiques sur la teneur et la composition en glycosides de stéviol et sur divers caractères morpho-physiologiques

1. EVALUATION DE LA VARIABILITE GENOTYPIQUE POUR LA TENEUR ET LA COMPOSITION EN GLYCOSIDES DE STEVIOL

Les résultats de cette section ont fait l'objet d'une publication scientifique.

Towards a semi-perennial culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni under temperate climate: effects of genotype, environment and plant age on steviol glycoside content and composition

Claire Barbet-Massin, Simon Giuliano, Lionel Alletto, Jean Daydé et Monique Berger

Genetic Resources and Crop Evolution 2015, Online First, DOI: 10.1007/s10722-015-0276-9

1.1. Introduction

Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni is a perennial shrub of the *Asteraceae* family native to northeastern Paraguay. This plant is in high demand by the pharmaceutical and food-and-beverage industries as a source of steviol glycosides (SVglys), which are low calorie and high potency natural sweeteners. The approval of SVglys as a food additive within the European Union in December 2011 developed the market for *S. rebaudiana* products. Since then, experimental cultivations have grown in Europe, which show the ability of the plant to be cropped under temperate climates. *S. rebaudiana* appears as a promising new crop in Europe, but next step along that path is a breeding effort to optimize SVgly content and composition.

SVglys are derived from the tetracyclic diterpenoid steviol (SV). SV glycosylation level generally varies from one to four sugar units (Woelwer-Rieck, 2012), but SVglys with up to seven sugar units have been identified (Ohta *et al.*, 2010). The sugar units are mainly *β*-glucose (Glc) and to a lesser extent *α*-rhamnose (Rhm) and *β*-xylose (Xyl). More rarely, *β*-fructose units have also been identified (Chaturvedula *et al.*, 2011b). The best known SVglys are Stevioside (ST), Rebaudioside A (RA), Dulcoside A (DA) and Rebaudioside C (RC) (Figure 17). They account for more than 95% of the total SVglys found in *S. rebaudiana* leaves. Typical proportions found in plants from unimproved populations of *S. rebaudiana* are 65.9% ST, 27.5% RA, 4.3% RC and 2.1% DA (Brandle, 1999). ST is estimated to be 250-300 times sweeter than sucrose but has a bitter aftertaste. RA is sweeter than ST (300-350 times

sweeter than sucrose) and has more pleasant sensory characteristics (Kennelly, 2002).

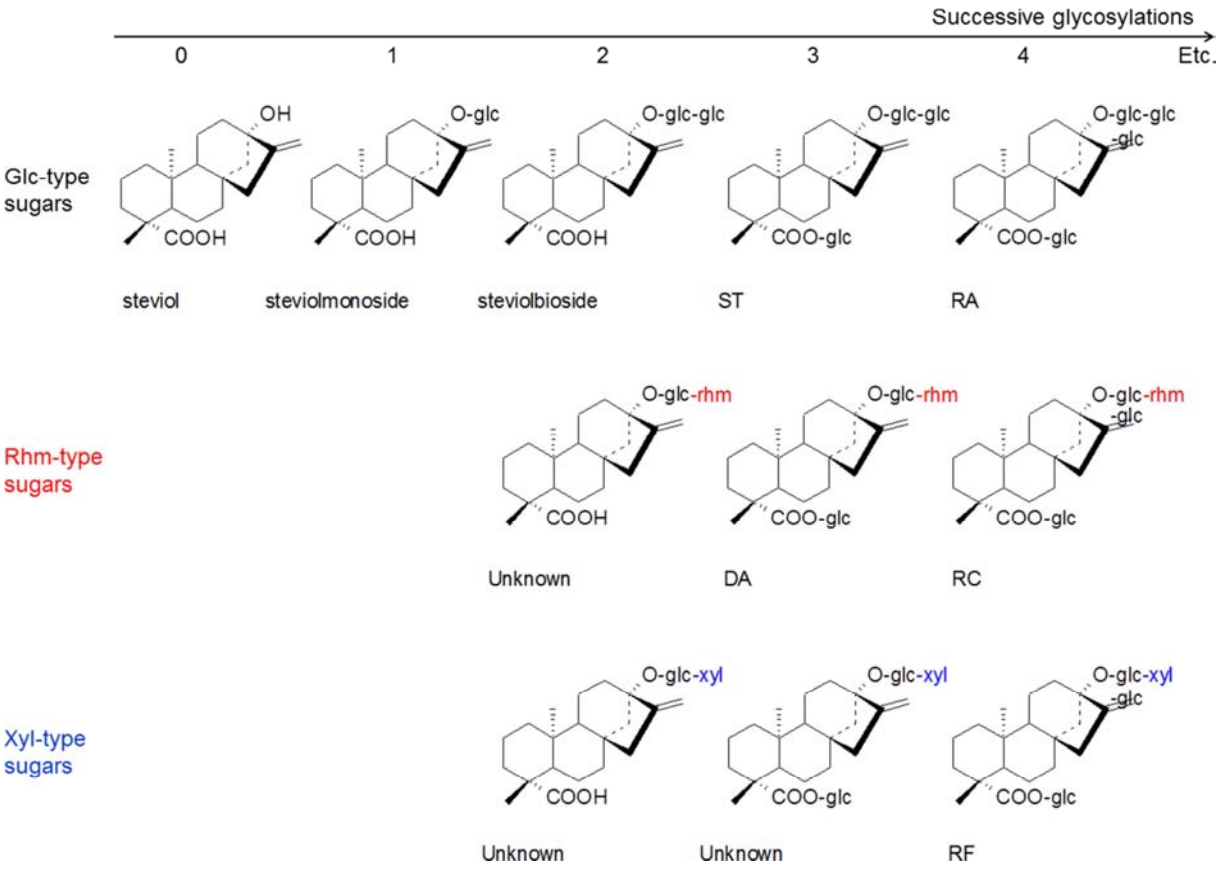


Figure 17 : Schematic representation of the main steviol glycosides.
SV, steviol; ST, stevioside; RA, rebaudioside A; DA, dulcoside A; RC, rebaudioside C; RF, rebaudioside F.

SVgly accumulation occurs preferentially in the leaves of *S. rebaudiana*. Their biosynthetic pathway shares steps in common with gibberellic acid (GA) formation. SV is synthetized via the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway, which occurs in the chloroplasts (Totte *et al.*, 2000). The isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate issued from the MEP pathway are converted to geranylgeranyl diphosphate (GGDP), which is then converted to kaurenoic acid through the action of copalyl diphosphate synthase (CPS), kaurene synthase (KS) and kaurene oxidase (KO) (Brandle and Telmer, 2007). Then the pathways leading to GA and SV diverge. SV is produced by hydroxylation of the kaurenoic acid at the C-13 position by the kaurenoic acid 13-hydroxylase (KAH), while GA_{12} is produced by oxidation at the C-7 position by the kaurenoic acid (Kim *et al.*, 1996) (Figure 18). SV is then glycosylated to form the different SVglys. The uridinediphosphate-dependant glycosyltransferases (UGTs) facilitating the conversion of SV to steviolmoniside, steviolbioside to ST and ST to RA have already been identified: *UGT85C2*, *UGT74G1* and *UGT76G1* (Richman *et al.*, 2005) (Figure 18). However, the understanding of the biosynthetic

pathways leading to DA, RC and rebaudioside F (RF) remain incomplete.

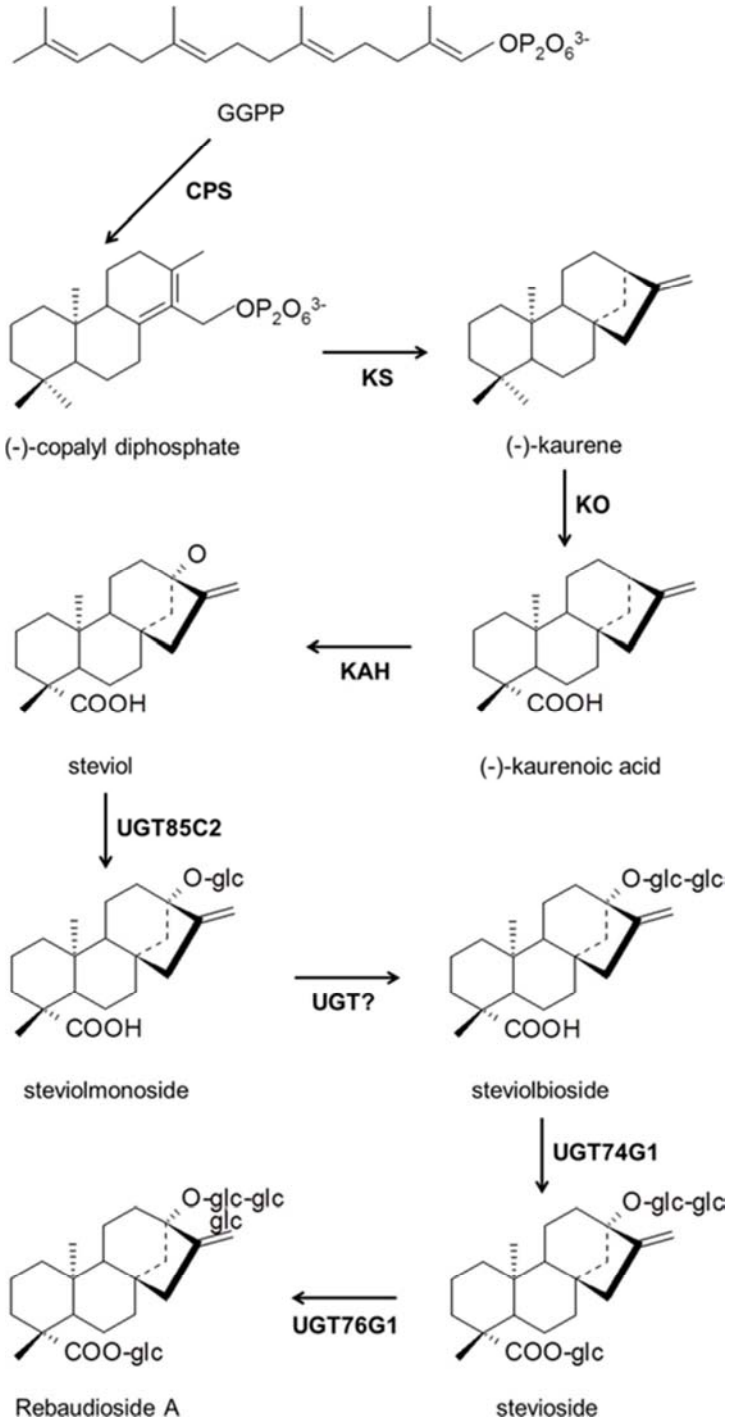


Figure 18 : Biosynthetic pathway of stevioside and its glycosides leading to rebaudioside A.
GGPP, geranylgeranyl diphosphate; CPS, copalyl diphosphate synthase; KS, kaurene synthase; KO, kaurene oxidase; KAH, kaurenoic acid hydroxylase; UGTs, UDP-glycosyltransferases.

SVgly total content and composition in *S. rebaudiana* leaves varies according to phenological stage and growth conditions (Brandle and Rosa, 1992; Brandle *et al.*, 1998). It is

generally admitted that SVgly content gradually increases up to the budding phase and the onset of flowering (Bondarev *et al.*, 2003; Ceunen and Geuns, 2013c). Some studies report the effect of agronomic practices on SVgly accumulation and *S. rebaudiana* productivity (Andolfi *et al.*, 2006; Lavini *et al.*, 2008; Kumar R. *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2013; Serfaty *et al.*, 2013; Angelini and Tavarini, 2014; Kumar *et al.*, 2014). However, findings on the effects of plant age on SVgly production are scarce, while *S. rebaudiana* could be cultivated as a plurennial plant when the climate allows winter survival of the plants. For a genotype reproduced by stem-cuttings and grown in Italy, an increase of the RA content and a decrease of the ST content were obtained during the second year of production (Tavarini and Angelini, 2013). The precise knowledge on SVgly accumulation as plant ages is still lacking.

The content of SVglys varies also widely according to genotype (Nakamura and Tamura, 1985; Tateo *et al.*, 1998; Gaurav *et al.*, 2008; Raji Akintunde and Mohamad, 2011). However, little is known on the genetic control of SVgly composition. First investigations on the genotypic variability for SVgly composition in a population have established three clusters: i) plants containing mainly Glc-type glycosides (ST and RA), ii) plants containing mainly Rhm-type glycosides (RC, DA) and iii) plants containing nearly equivalent quantity of Glc- and Rhm-type glycosides (Nakamura and Tamura, 1985). Another study focused on the genetic control of the proportions of RA and RC (Brandle, 1999). It has been hypothesized that the presence/absence of RA is controlled by a single gene, but that the proportion of RA may be controlled by an additional loci with multiple alleles. Indeed, it has recently been shown that a nonsense mutation in UGT76G1 induced a premature protein and caused the low levels (or absence) of RA (Yang *et al.*, 2014). In the study of Brandle (1999), the presence/absence of RC matched the pattern of segregation of RA perfectly. Thus it has been suggested that RC and RA, compounds equally glycosylated differing only in the nature of one sugar unit, are synthesized by the same enzyme (Brandle, 1999). A better understanding of the genotypic control of SVgly composition would be of interest for plant breeding.

The present investigation was undertaken to assess the variability in SVgly content and composition among *S. rebaudiana* genotypes. Their adaptation to semi perennial cropping system under temperate climate was evaluated through wintering survival and evolution of SVgly accumulation in two year old plants.

1.2. Materials & Methods

1.2.1. Plant material and growth conditions

1.2.1.1. 2012 field experiment (Planting year (PY) = 2012; Plant age (PA) = 1 year)

A set of 96 genotypes of *S. rebaudiana* was randomly chosen in a population of "Criola" (a native population originating from Paraguay). These genotypes were reproduced by stem cuttings from greenhouse grown stock plants, during the year 2011/2012.

The 96 genotypes were transplanted to field at the beginning of July 2012 at the INP-EI Purpan Nursery Station (site III), Toulouse, France (43°36'N, 1°24'E). Five of these 96 genotypes (G1 to G5) were also transplanted to field at the end of June 2012 at the INP-EI Purpan Experimental Station (site IV), Seysses, France (43°29'N, 1°14'E). On both sites, plant spacing was 30 cm x 60 cm. On site III, there was one individual plot (24 plants) for each genotype. On site IV, there were 36 plots. Each plot was a mixed-population of the five genotypes (5 to 7 plants / genotype; 48 plants / plot).

All genotypes were harvested in September 2012 at flower budding stage. One site III, three plants per genotype were pooled (n=1 sample per genotype). On site IV, for each plot, all the plants from the same genotype were pooled (n=36 samples per genotype).

1.2.1.2. 2013 field experiment (PY = 2012, PA = 2 years ; PY = 2013, PA = 1 year)

New cuttings were produced in 2012/2013. On site III, only 16 genotypes (G1; G2; G6-G19) survived to winter. Cuttings of eight of these genotypes (G6 to G13; 10 to 24 cuttings / genotype) were transplanted to field in July 2013, adjoining the two-year old plants of the same genotypes. On site IV, only six plots survived to winter flooding. Cuttings of the 5 genotypes (G1 to G5) were transplanted in July 2013 (18 mixed-population plots; 5 to 7 plants / genotype; 33 plants / plot), next to the two-year old plants.

Both one-year old and two-year old plants were harvested at flower budding stage in September 2013. On site III, three plants per genotype were pooled for the one-year old plants (n=1 sample per genotype). For the two-years old plants, three plants per genotype were sampled separately (n=3 samples per genotype). On site IV, for each plot, all the plants from the same genotype were pooled (for the one-year old plants, n=18 samples per genotype; for

the two-year old plants, n=6 samples per genotype).

1.2.2. Steviol glycosides content and composition in leaves

For each sampling, the aerial part of the plants was harvested. Leaves and stems were separated by hand and dried at 40°C for 48h. 100 mg of dried and finely ground leaves were extracted with 10 mL water at 50°C for 30 min. After centrifugation (7000 t/min, 5 min) and filtration (0.2 µm), 20 µL of the resulting solution were injected into a high-performance liquid-chromatography system on a C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm particle size; Luna C18 Phenomenex, USA). SVglys were eluted with an isocratic phase of ACN 31%: acidified H_2O 69% (pH=2.6, HCOOH) at 1 mL/min flow rate for 30 min. The SVglys (including ST, RA, RC, RF and DA) were detected at 200 nm. They were identified using a mixed solution of nine SVglys (JECFA Mixed Solution, Chromadex, USA). For quantification, stevioside was used as external standard. Results were expressed as quantity per unit leaf dry mass ($mg.g^{-1}$ DM) for each SVgly and for the SVglys total content. The individual proportion of each SVgly was also expressed as the percentage of the SVgly total content.

1.2.3. Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the software R.2.15.1 (R Core Team, 2013). Genotypic variability observed within the clones on the nursery field was analyzed using Principal Components Analysis from the package FACTOMINER. The best typology was established using hierarchical clustering. On each site, a three-way analysis of variance was used to determine if the plant age (PA), the planting year (PY), the genotype (G) and their interactions affected SVgly content and composition. In the case of unreplicated ANOVA (site A, one year old plants), the interactions between factors were not studied. Significant differences between the treatments were determined by using Tukey's honestly significant difference (HSD) test from the package AGRICOLAE.

1.3. Results

1.3.1. Genotypic variability in steviol glycosides content and composition

The 96 genotypes grown on site III in 2012 displayed high variability for the total SVgly content (45.7 to 122.9 mg.g^{-1} DM). A wide range of variability was also observed on the SVgly composition, leading to a classification of the plants into four clusters (Figure 19 and Figure 20). The PCA projected 99% of the 96 genotypes variability on three independent dimensions (Figure 19). The first dimension represented more than 50% of the variability. On this axe, genotypes were ranked from high ST proportions to high RA proportions. The second dimension described the genotypic variability from low to high minor SVgly proportions. The third dimension, orthogonal to the first plane, represented variability from low to high SVgly total content (not shown on Figure 19). Thus, the SVgly total content (mg.g^{-1} DM) was not correlated with the individual SVgly proportions. Moreover, these results showed that composition represents the major part of the genotypic variability observed in these genotypes.

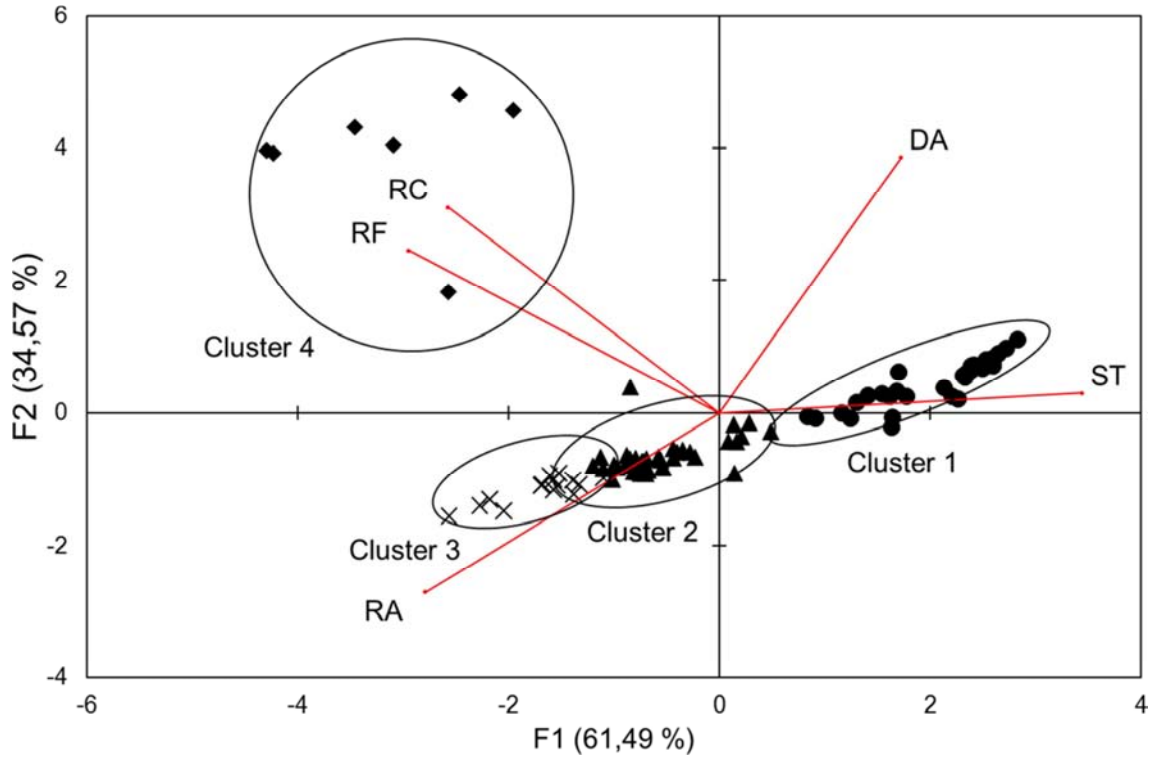


Figure 19 : Biplot obtained from the Principal Component Analysis, performed on 96 genotypes (site III) and based on proportions of the main SVglys, expressed in percentage of total SVgly content.
SVgly, steviol glycosides; ST, stevioside; RA, rebaudioside A; DA, dulcoside A; RC, rebaudioside C; RF, rebaudioside F.

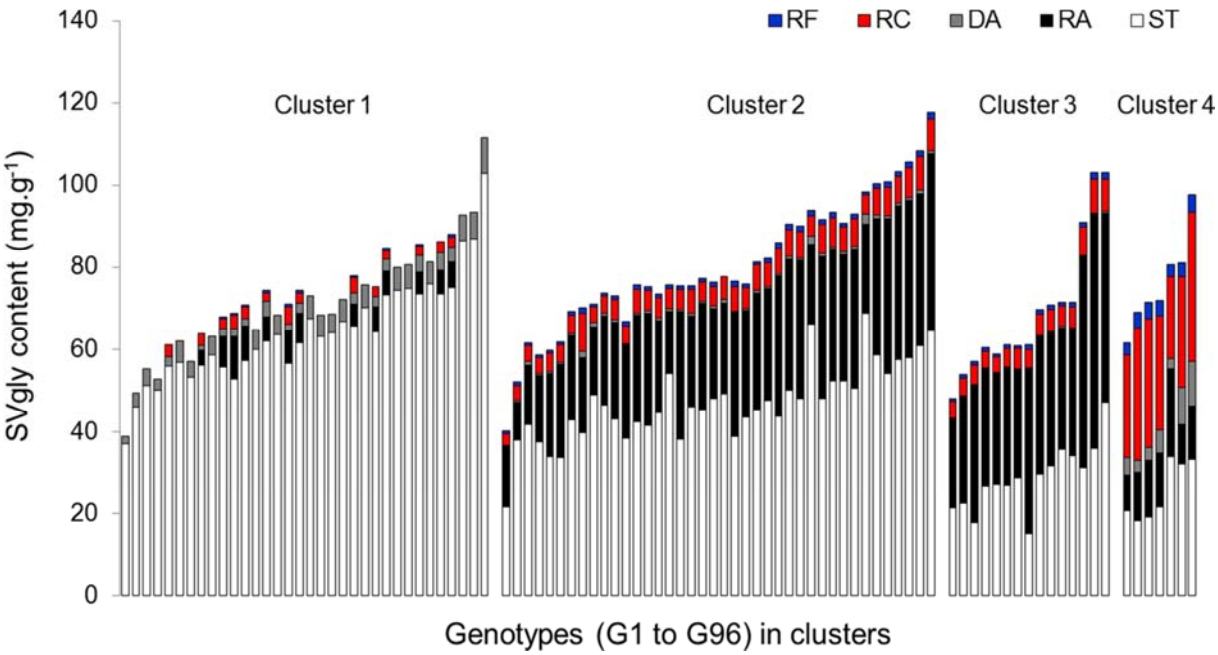


Figure 20 : Hierarchical clustering results.

Cluster 1 genotypes contained little or no RA, RC and RF. The presence/absence of RC and RF perfectly matched the segregation pattern of RA. Cluster 2 genotypes had high levels of ST and RA. The amount of RA was higher than that of ST for the genotypes of cluster 3. Genotypes with high level of minor SVglys (in particular RC) were grouped in cluster 4.

1.3.2. Environmental effects on steviol glycosides content and composition

Genotype (G), plant age (PA), planting year (PY) effects and their interactions (G x PA; G x PY) were significant for total SVgly accumulation (Table 6). The SVgly content generally increased in two-year old plants compared to one-year old plants (Figure 21). Nevertheless, the magnitude of the increase seemed genotype dependent (from +12% to +152%; mean increase +40%). A decrease of SVgly content was observed for one genotype only (G1, site IV, -11%; Figure 21). Although significant, the effect of planting year (PY) was less pronounced than that of plant age (PA) (Figure 21).

Genotypes G1 and G2 were on both sites (Figure 21) and displayed genotype x location interaction. For G1 on site III, SVgly content increased from 91.2 to 126.1 mg.g^{-1} DM as plant aged, while it decreased on site IV, from 117.8 to 105.3 mg.g^{-1} DM. G2 SVgly content increased between one-year and two year old plants on both sites but this increase was higher on site IV (102.3 mg.g^{-1} DM *vs.* 122.6 mg.g^{-1} DM on site III and of 115.0 mg.g^{-1} DM *vs.*

152.5 mg.g^{-1} DM on site IV) (Figure 21).

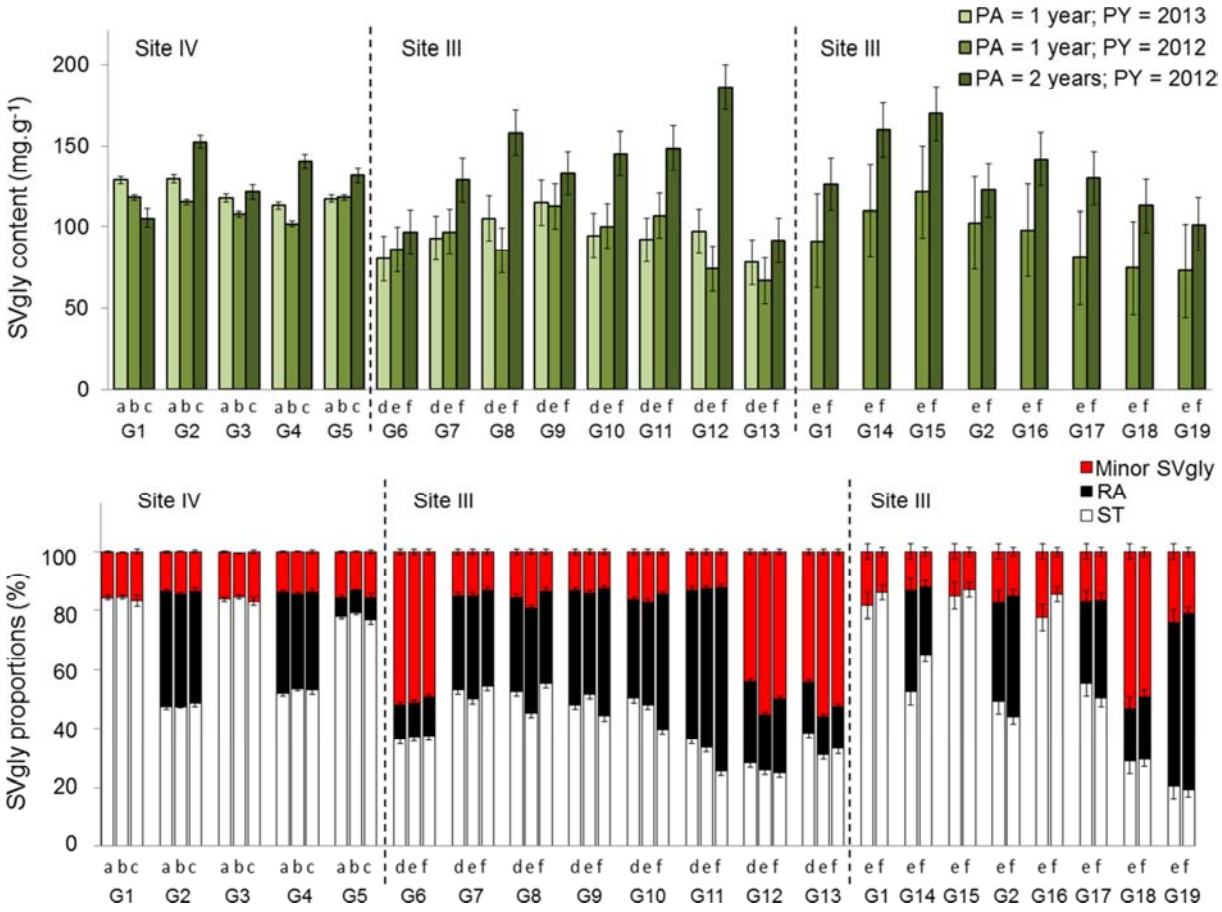


Figure 21 : SVgly content (mg.g^{-1} DM; mean ± SEM) and individual SVgly proportions (% of SVgly total content; mean ± SEM) in one-year old (planted in 2012 & 2013) and two-year old (planted in 2012) genotypes of *S. rebaudiana* on sites III & IV (PA: plant age).

SEM was calculated from the ANOVA residual mean square. (a) Site IV, PA = 1 year, PY = 2013, n = 18; (b) Site IV, PA = 1 year, PY = 2012, n = 36; (c) Site IV, PA = 2 years, PY = 2012, n = 6; (d) Site III, PA = 1 year, PY = 2013, n = 1; (e) Site III, PA = 1 year, PY = 2012, n = 1; (f) Site III, PA = 2 years, PY = 2012, n = 3. SVgly, steviol glycosides; ST, stevioside; RA, rebaudioside A.

In contrast, neither the plant age nor the planting year affected the proportion of the two major SVglys (ST and RA).The genotype only had a significant effect on these traits (Table 6, Figure 21). However, a significant effect of the plant age and of the planting year was recorded for the minor SVglys, as well as their interactions with genotype (Table 6).

Table 6 : Probability values from the three-way ANOVA on SVgly content (mg/g) and composition (ST, RA & minors SVglys in % of total SVglys) in leaves of *Stevia rebaudiana* plants on the two location sites.

Location site	Steviol glycosides	Plant age (PA)	Genotype (G)	Planting year (PY)	Significant interactions (P < .01)
Site III	Total content	< .001		< .05	
	ST proportion		< .001		
	RA proportion		< .001		
	Minors SVgly proportion		< .001		
Site IV	Total content	< .001	< .001	< .001	G X PA ; G X PY
	ST proportion		< .001		
	RA proportion		< .001		
	Minors SVgly proportion	< .01	< .001	< .01	G X PA ; G X PY

Plant age (PA) = 1 year, 2 years. Plant genotype (G) = A to H and I to M. Planting year (PY) = 2012, 2013. SVgly, steviol glycosides; ST, stevioside; RA, rebaudioside A.

1.4. Discussion

This study showed high genotypic variability, and thus breeding potentialities, for SVgly content and composition. The total SVgly content recorded in the present work (from 45.7 to 186.2 $mg.g^{-1}$ DM) was in agreement with those reported in the literature (Brandle *et al.*, 1998; Geuns, 2003) and the mean profile obtained among the 96 genotypes studied here is in accord with other studies on stevia populations described by Brandle (1999) (*i.e.* 2.1% DA, 4.3% RC, 27.5% RA and 65.9% ST). However, the 96 genotypes population displayed a wide range of SVgly composition, with higher RA than ST content in some genotypes whereas others had very high proportion of minor SVglys (up to 52% of the total SVgly content). RA has a greater economic value than ST as an alternative sweetener (Andolfi *et al.*, 2006). Thus, the endogenous RA to ST ratio in leaves is an important criterion to validate clones for commercial production.

It is well-known that SVgly content in leaves may vary between 4 and 20% depending on environmental and agronomic factors (Metivier and Viana, 1979; Geuns, 2003). In this study, SVgly total content varied widely over time and among different environments. Furthermore, strong G x E interactions were emphasized and need to be taken into account in the choice of genotypes for cultivation. The positive effect of plant age on biomass accumulation is well described elsewhere (Andolfi *et al.*, 2006). The present study indicates that this phenomenon can be combined with an increased SVgly concentration in leaves, thus amplifying the positive effect of plant age on *S. rebaudiana* productivity.

While SVgly content varied among the different environments, SVgly composition remained stable, indicating a higher genotypic determinism for this trait than for total content. During the last decade, several studies have shown that the MEP pathway is regulated by carbon and nitrogen status and that one of its intermediates could be implicated in environmental stress responses (Ward *et al.*, 2011; Hemmerlin, 2013; Banerjee and Sharkey, 2014). Studies on *S. rebaudiana* have shown the importance of KO and KAH (Figure 18) in determining SVglys total content (Kumar H. et al 2012a; Guleria and Yadav, 2013). UGT85C2, which catalyze the formation of steviol from kaurenoic acid and of steviolmonoside from steviol, might also be a rate limiting step for the SVgly biosynthesis route (Mohamed *et al.*, 2011; Guleria and Yadav, 2013). On the other hand, the relative stability of the SVglys composition suggests that the UGTs are less regulated by environment. However, highly contrasted environments and ontogenetic signals may have an effect on steviol glycosylation: studies at the whole plant level (Tavarini and Angelini, 2013) or a the leaf level (Mohamed *et al.*, 2011; Ceunen and Geuns, 2013c) reported that the ratio of RA to ST was influenced by ontogeny, day length and leaf age.

In the present study, the occurrence of genotypes devoid of RA and RC and their co-segregation is in agreement with the hypothesis of a single enzyme synthetizing both RA and RC (Brandle, 1999). The same segregation pattern was obtained for the equally glycosylated RF (Figure 17). Thus, as for RA and RC, the glycosylation step leading to RF is probably also catalyzed by the UGT76G1. SVgly total content was not correlated with composition. For example, in some genotypes, high levels of minor SVglys were recorded together with high total content. This suggests that the glucosylation pathway may be less active than the rhamnosylation and xylosylation pathways in such genotypes. Further investigations are needed to validate these two assumptions.

In conclusion, our experiments showed a high genotypic variability for SVgly content and composition. SVgly content varied with environment and over years in perennial culture, while SVgly composition was less affected by these factors. Beside leaf yield, SVgly total content and composition are determinant factors for *Stevia rebaudiana* productivity. SVglys quality relies on the early breeding of genotypes having the desired composition and SVglys productivity depends on the establishment of the best ideotype for a given location and culture mode (perennial of annual). Indeed, we observed that some plants accumulated more SVgly in the second year of production, underlying their interest for a perennial or semi-perennial cropping of *Stevia rebaudiana* when the climate and/or genotype adaptation allows it.

2. EVALUATION DE LA VARIABILITE DE CARACTERES MORPHO-PHYSIOLOGIQUES

2.1. Introduction

En France, l'évaluation variétale est réalisée afin de s'assurer de la stabilité et de l'intérêt d'une nouvelle variété. L'épreuve DHS, ou Distinction – Homogénéité – Stabilité, permet de vérifier que le nouveau génotype est bien distinct de tout génotype déjà connu, que toutes les plantes de ce génotype sont semblables et qu'à la suite de reproductions successives, le génotype reste stable et conforme à la définition de ses principales caractéristiques (GNIS, 2003). La mise au point de cette épreuve pour *S. rebaudiana* nécessite au préalable l'identification de critères phénotypiques stables, permettant une description des génotypes.

La longueur de jour critique pour l'induction de la floraison est de 13 h en moyenne, et peut varier de 8 à 14 h selon le génotype (Brandle *et al.*, 1998). Une variabilité phénotypique a également été observée sur des caractéristiques morphologiques en lien avec le rendement foliaire : longueur et largeur des feuilles, nombre de feuilles par plante, ratio feuilles/tiges, hauteur de la plante, nombre d'inflorescences (Brandle et Rosa, 1992 ; Gaurav *et al.*, 2008). Par ailleurs, *S. rebaudiana* s'est révélée sensible à plusieurs maladies fongiques, induites par les agents pathogènes *Septoria steviae* (Reeleder, 1999), *Alternaria alternata* (Ishiba *et al.*, 1982), *Sclerotinia sclerotiorum* (Chang *et al.*, 1997), *Sclerotium rolfsii* (Kamalakannan *et al.*, 2007), *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizoctonia solani* et *Sclerotium dephinii* (Maiti *et al.*, 2007). Certains génotypes ont montré une meilleure résistance à *Septoria steviae* et *Alternaria alternata*.

Les mesures morpho-physiologiques présentées dans cette section, relatives à la morphologie des feuilles, au port de la plante, à sa précocité et à sa sensibilité aux maladies, ont été réalisées dans le but d'identifier des caractères phénotypiques adaptés à la description de l'espèce.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Matériel végétal et conditions de croissance

Les notations ont été réalisées au cours de l'été 2012, sur les 96 génotypes (G1 à G96) transplantés en champ sur le site III au début du mois de Juillet 2012, et dont la variabilité de la teneur et de la composition en SVglys a été présentée dans la section précédente. Les conditions de croissance sont aussi décrites dans la section précédente.

2.2.2. Mesures

2.2.2.1. Morphologie des feuilles

Pour les feuilles, trois caractéristiques morphologiques ont été décrites (Figure 22) : *i)* leur taille : la distinction a été faite entre les feuilles petites, moyennes et grandes ; *ii)* leur couleur : quatre couleurs ont été retenues : vert pâle (V-), vert (V), vert foncé (V+) et vert argenté (VA) ; *iii)* leur état en milieu de journée en plein soleil, qui reflète la réponse de la plante à un stress hydrique. En effet, en milieu de journée (quand le stress hydrique est maximal), la sécheresse provoque une diminution de la conductance stomatique et du potentiel hydrique des feuilles (Ψ_{MID}, *Midday Water Potential*) (Lambers *et al.*, 2008). Le paramètre décrit ici (MDWSR, *Midday Water Stress Response*) permet d'approcher indirectement le statut hydrique des feuilles et le mécanisme de réponse des plantes face à un stress hydrique. Trois désignations ont été retenues : feuille « basse » (turgescence réduite) ; feuille « droite » (turgescence maintenue) ; feuille « haute » (turgescence maintenue, la feuille s'enroule sur elle-même).

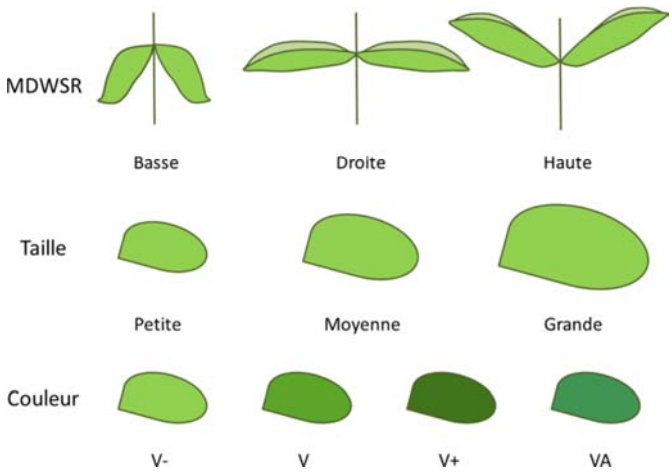


Figure 22: Description de la morphologie des feuilles.
MDWSR, *Midday Water Stress Response* ; V-, vert pâle ; V, vert ; V+, vert foncé ; VA, vert argenté.

2.2.2.2. Morphologie et précocité des plantes

Les plantes ont été décrites comme buissonnantes ou peu ramifiées. A l'issue d'une campagne d'observation en champ, les génotypes ont été notés sur 10, en tenant compte de leur résistance face aux intempéries (pluie, vent) et aux maladies.

Un suivi des stades des génotypes a également été réalisé : les plantes d'un même génotype ont été décrites comme étant au stade végétatif (V), bouton floral (BF) et pleine floraison (F) dès que 50% d'entre elles avaient atteint ce stade. Ces notations ont permis d'établir trois catégories de précocité des génotypes, selon la date à laquelle 50% des plantes avaient atteint le stade BF : précoce (15-30 Août), intermédiaire (01-15 Septembre), tardif (16 Septembre-05 Octobre).

2.2.3. Traitement des résultats

Les notations réalisées ont été traitées à l'aide de statistiques descriptives : histogramme de répartition pour la morphologie foliaire, histogramme des proportions pour le port et la précocité des plantes, histogramme des effectifs pour l'évaluation des génotypes sur l'ensemble des caractères morpho-physiologiques mesurés.

2.3. Résultats et discussion

2.3.1. Caractéristiques morphologiques des feuilles

Une grande variabilité de morphologie foliaire a été observée au sein des 96 génotypes de la collection étudiée en 2012. Des morphologies-types et comportements physiologiques associés sont ressortis des notations réalisées (Figure 23). Les petites feuilles sont généralement vertes (V), vert foncé (V+) ou vert argenté (VA). Elles sont « droites » ou « hautes » en réponse au stress hydrique de milieu de journée (MDWSR). Cet aspect peut être associé à une fermeture précoce de leurs stomates et un maintien de leur turgescence. Les grandes et moyennes feuilles sont généralement vertes (V) ou vert pâle (V-). 50% des feuilles de taille moyenne et 66% des grandes feuilles sont « basses » en réponse au stress hydrique de

milieu de journée (MDWSR). Cet aspect peut être associé à une diminution de leur turgescence et à une fermeture tardive de leurs stomates.

Deux mécanismes des plantes en réponse à un stress hydrique sont décrits dans la littérature : l'évitement et la tolérance. Les plantes qui emploient la stratégie de l'évitement empêchent les dommages liés à un stress hydrique par la fermeture de leurs stomates avant que le statut hydrique des feuilles n'ait changé, alors que les plantes tolérantes à la sécheresse présentent une diminution simultanée de la conductance stomatique et du potentiel hydrique des feuilles (Guehl *et al.*, 1991; Picon *et al.*, 1996). Ainsi, les plantes aux petites feuilles de la collection étudiée ici semblent répondre au stress hydrique de milieu de journée par l'évitement, alors qu'une majorité des plantes aux feuilles grandes et moyennes semble y répondre par la tolérance.

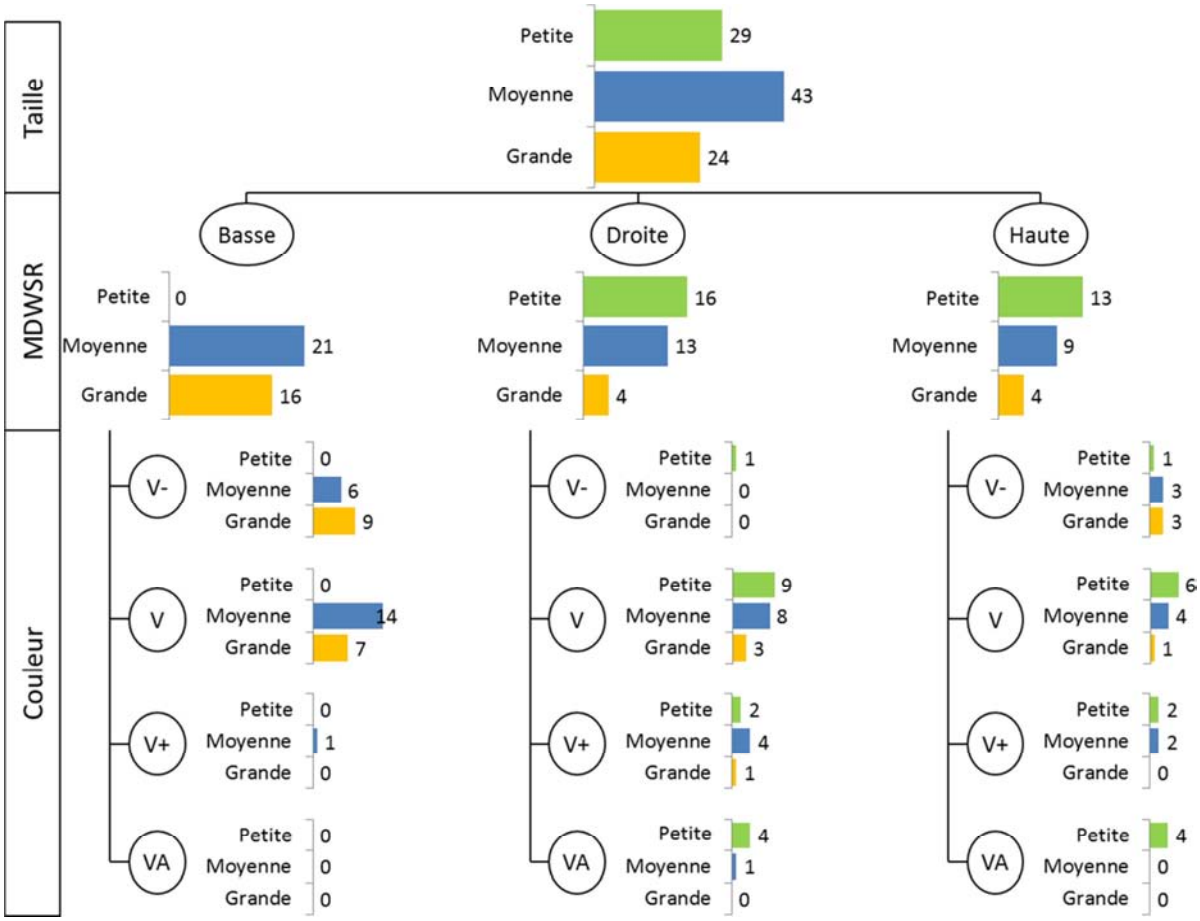


Figure 23 : Histogramme de répartition des 96 génotypes de la population de *S. rebaudiana* étudiée, selon leur caractéristiques foliaires : taille ; MDWSR, couleur.
MDWSR, Midday Water Stress Response ; V-, vert pâle ; V, vert ; V+, vert foncé ; VA, vert argenté.

2.3.2. Caractéristiques morphologiques et de précocité des plantes

Les plantes de la collection étudiée ont également été décrites par leur port, buissonnant ou peu ramifié, et leur précocité (Figure 24). La variabilité observée pour la précocité (plantes précoces, intermédiaires ou tardives pour l'apparition du stade BF) reflète la variabilité de sensibilité à la photopériode des génotypes pour l'induction de leur floraison. Les génotypes dits précoces ont atteint le stade BF dès la deuxième quinzaine d'Août, alors que la longueur de jour est comprise entre 13,2 et 14h. Les génotypes dits intermédiaires ont atteint le stade BF au cours de la première quinzaine de Septembre, sous une longueur de jour comprise entre 13,2 et 12,5h. Enfin, les génotypes dits tardifs ont atteint le stade BF à partir du 16 Septembre et jusqu'au 05 Octobre, sous une longueur de jour comprise entre 12,4 et 11,5h.

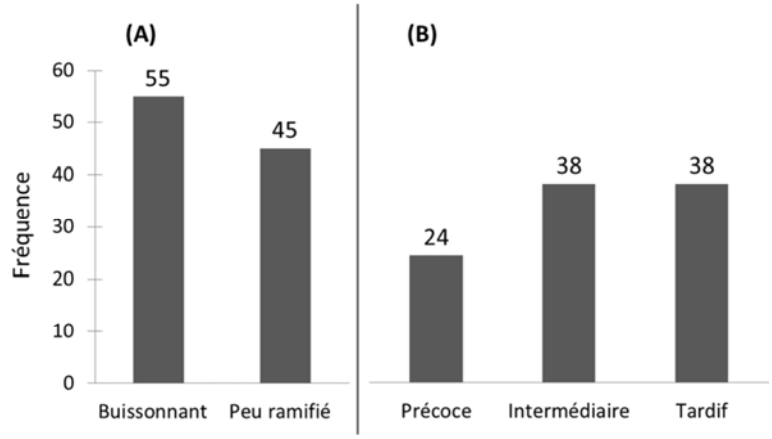


Figure 24 : Histogrammes des proportions sur les critères de port de plantes (buissonnant, peu ramifié) et de précocité (précoce, intermédiaire, tardif) pour les 96 génotypes de la population de *S. rebaudiana* étudiée.

2.3.3. Evaluation des génotypes sur l'ensemble des caractères morpho-physiologiques

A l'issue de la campagne d'observation en champ de 2012, les génotypes ont été notés sur 10 en tenant compte de leur résistance face aux intempéries et aux maladies (Figure 25). Seuls 9 génotypes sur les 96 étudiés présentent des notes élevées (8/10 et 9/10). Les caractéristiques morphologiques, de précocité et de teneur et de composition en SVglys de ces génotypes sont présentées dans le Tableau 7. Cinq d'entre eux ne contiennent pas ou peu de RA. Ainsi, dans le cadre d'un processus de sélection variétale à forte pression de sélection, seuls 4 génotypes de la collection pourraient être retenus.

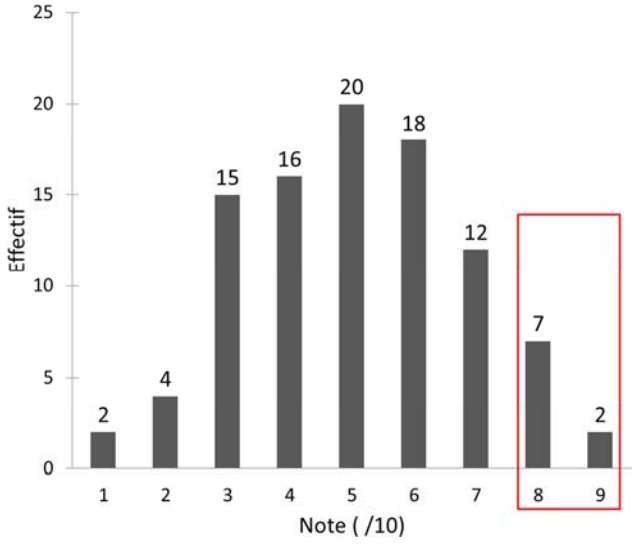


Figure 25 : Histogramme des effectifs des 96 génotypes de la population de *S. rebaudiana* étudiée pour une note allant de de 1 à 10, selon la résistance des génotypes aux maladies et intempéries.

Tableau 7: Caractéristiques morphologiques, de précocité et de teneur et composition en SVglys des 9 génotypes ayant eu une note de 8/10 ou de 9/10 pour leur résistance aux maladies et intempéries.

Génotype	Port	Précocité	Caractéristiques foliaires			Teneur et composition en Svglys		
			Couleur	taille	MDD réponse	Teneur (% MS feuilles)	Proportion ST (%)	Proportion RA (%)
G1	peu ramifié	intermédiaire	V+	petite	haute	9,1%	82%	0%
G11	buissonnant	tardif	V	moyenne	droite	9,6%	76%	6%
G17	peu ramifié	intermédiaire	V	moyenne	basse	6,8%	50%	30%
G35	buissonnant	précoce	V-	moyenne	basse	8,0%	48%	29%
G38	peu ramifié	intermédiaire	V-	grande	basse	8,5%	51%	30%
G46	peu ramifié	tardif	V-	grande	basse	6,5%	42%	42%
G60	buissonnant	tardif	V+	moyenne	droite	8,5%	83%	0%
G90	buissonnant	tardif	V+	moyenne	haute	8,5%	75%	7%
G95	buissonnant	tardif	V+	moyenne	droite	8,2%	81%	0%

Parmi les 9 génotypes présentés dans le Tableau 7, ceux ne contenant pas ou peu de RA ont des feuilles de couleur verte (V) ou vert foncé (V+). Les autres génotypes, ayant du RA en proportion élevée, ont des feuilles de couleur verte (V) ou vert pâle (V-). La même tendance a été observée à l'échelle de la population entière étudiée (96 génotypes) : les plantes aux feuilles foncées ont en général des proportions faibles à nulles de RA (Figure 26). Ces observations ont été faites sur un faible nombre de génotypes, sur une année seulement, et ne permettent pas de conclure sur la relation entre la couleur des feuilles et leur composition en SVglys. Il s'agit néanmoins d'observations préliminaires à explorer sur des collections plus larges.

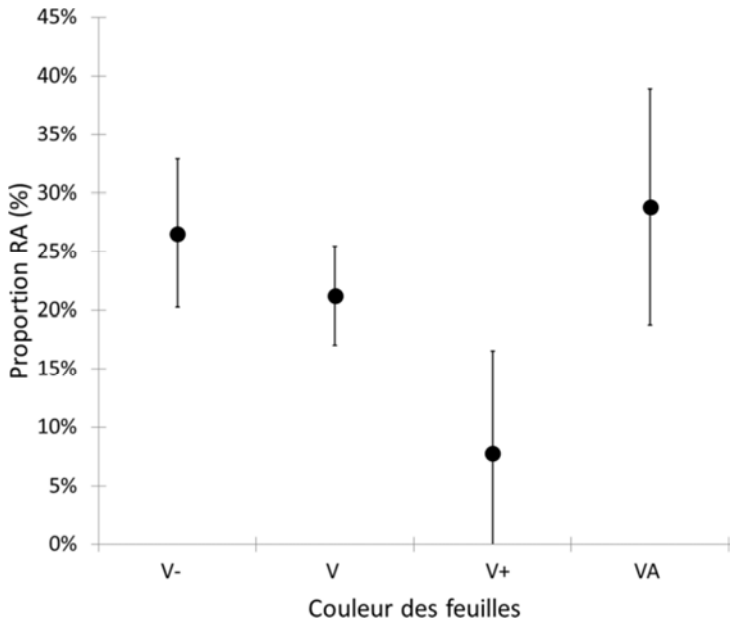


Figure 26 : Valeur moyenne et écart-type de la proportion de RA selon la couleur des feuilles chez les 96 génotypes de la population de *S. rebaudiana* étudiée.

2.4. Conclusion

Ce premier travail de description phénotypique d'une population de *S. rebaudiana* a permis d'identifier une variabilité entre les génotypes suffisante pour établir des distinctions sur des critères morphologiques et de précocité. En vue de la définition de critères pour l'épreuve DHS, un travail plus approfondi est nécessaire, afin de proposer des caractères pouvant être décrits et reconnus avec précision et qui permettent de vérifier les critères d'homogénéité et de stabilité. Ces caractères doivent être évalués sur plusieurs lieux une deuxième année, afin d'évaluer leur robustesse.

Chapitre 5. Caractérisation de clones dans différents contextes pédoclimatiques

1. INTRODUCTION

En vue d'un travail de sélection variétale de *S. rebaudiana*, et pour l'identification des conditions agronomiques adaptées à la culture de cette plante, il est nécessaire de tenir compte des interactions génotype – environnement (IGE). Les résultats du chapitre 4 ont montré, sur deux sites peu contrastés, une variabilité de la teneur en SVglys selon le génotype et l'environnement, et des IGE. La composition en SVglys est apparue principalement influencée par le génotype et est restée stable au travers des différents environnements. Ce premier travail exploratoire suggère une variabilité suffisante entre les plantes pour réaliser un travail de sélection variétale, mais n'a pas permis d'évaluer la robustesse de ces caractéristiques, ni d'identifier les conditions de culture favorables ou défavorables pour l'implantation de *S. rebaudiana* sous nos climats.

Au-delà des conditions de croissance durant le cycle de végétation de *S. rebaudiana*, la date de récolte est un facteur d'importance pour l'évaluation de la productivité des clones. Les jours courts induisent en effet la floraison et la teneur en SVglys dans les feuilles a tendance à stagner ou à décroître au-delà de l'induction florale (Zaidan *et al.*, 1980 ; Bian, 1981 ; Vanidze *et al.*, 2009 ; Ceunen *et al.*, 2011). Le déclin parfois observé à la floraison reste un mécanisme à ce jour non-expliqué. Il pourrait s'agir d'une dégradation oxydative par des espèces réactives de l'oxygène (Ceunen et Geuns, 2013a). Les SVglys pourraient également être transportés vers les organes reproductifs (Bondarev *et al.*, 2003) ou dégradés par des *β*-glycosidases endogènes (Madore, 2000). La photopériode peut aussi avoir un effet sur l'accumulation en SVglys au-delà de son effet indirect d'induction de la phase reproductive : une teneur en SVglys presque deux fois plus faible a été obtenue sous jours courts par rapport à des conditions de jours longs (Metivier et Viana, 1979). Ainsi, l'optimum de récolte peut varier selon la précocité du génotype et selon la durée du jour sous laquelle il atteint le stade bouton floral.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les IGE chez *S. rebaudiana* pour l'élaboration de son rendement en milieu tempéré. Trois génotypes, aux caractéristiques morphologiques, de précocité et de teneur et composition en SVglys variables, ont été étudiés sur quatre sites pendant un an. Par ailleurs, des prélèvements à trois stades (végétatif, bouton floral, floraison) ont été réalisés afin de déterminer l'optimum de récolte pour trois génotypes aux précocités différentes. L'étude de la teneur et de la composition en SVglys aux différents stades de prélèvement permet d'apporter des éléments de réponse quant à leur devenir dans la plante.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériel végétal et conditions de croissance

2.1.1. Matériel végétal

Les trois génotypes étudiés sont les génotypes A, B et C (précédemment désignés comme G2, G20 et G21). Ces trois génotypes ont été étudiés sur la période 2011-2014 au travers de multiples expérimentations et sont bien connus. Leur composition en SVglys est stable : les génotypes A et C contiennent du ST, du RA et des SVglys mineurs (DA, RC, RF), alors que le génotype B ne contient pas de RA (ni de RC et RF). Ces trois génotypes possèdent également des caractéristiques phénotypiques distinctes (Tableau 8 et Figure 27).

Tableau 8 : Caractéristiques phénotypiques des génotypes A, B et C.

Génotype	A	B	C
Port de la plante	Tige principale épaisse Port buissonnant LMR élevé	Tige principale épaisse Port peu ramifié LMR faible	Tige principale fine Port très buissonnant LMR moyen
Hauteur de la plante	Moyenne	Haute	Basse
Feuilles: Taille Couleur MDWSR	Grande Vert pâle (V-) Tombante	Grande Vert foncé (V+) Haute	Petite Vert pâle (V-) Droite
Résistance aux maladies	Faible	Forte	Moyenne
Précocité (Date stade BF)	Précoce (fin Août)	Tardive (mi/fin Septembre)	Précoce (fin Août)
Teneur en SVglys (en 1ère année)	10-15%	7-8%	10%
Proportion de RA	30-32%	0%	33-35%

MDWSR, Midday Water Stress Response ; SVglys, glycosides de stéviol ; LMR, leaf mass ratio



Figure 27 : Photographie des trois génotypes A, B et C.

2.1.2. Conditions de culture et prélèvements

Les plantes ont été reproduites par bouturage pendant l'année 2013/2014 puis rempotées en godets, avant d'être transplantées en champ à la fin du mois de Mai 2014 sur les sites I, II, III et IV (*cf.* Partie 1, chapitre 3). Sur chaque site d'essai, l'expérimentation a été réalisée sous la forme d'un RCBD (*Randomized Completely Block Design*) à trois blocs, avec une microparcelle par génotype au sein de chacun des blocs. Chaque microparcelle était constituée de 60 plantes. La densité de plantation était de 6,5 plantes.m^{-2} (0,5 x 0,3 m) sur le site I ; de 10 plantes.m^{-2} (0,5 x 0,2 m) sur le site II ; de 6,5 plantes.m^{-2} (0,5 x 0,3 m) sur le site III ; et de 8 plantes.m^{-2} (0,4 x 0,3 m) sur le site IV. L'essai a été réalisé en plein champ sur les sites I et IV ; sur toile hors sol sur le site III ; et sur butte bâchée sur le site II. L'irrigation a été réalisée par aspersion (sprinkler) sur les sites I, III et IV ; au goutte-à-goutte sur le site II. Aucun des quatre sites n'a été fertilisé durant la campagne d'expérimentation. Les caractéristiques agronomiques, les données climatiques et les itinéraires techniques des quatre sites d'essai pour la campagne 2014 sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Caractéristiques agronomiques, itinéraires techniques et données climatiques des quatre sites d'essai (campagne 2014).

Caractéristiques climatiques De la transplantation à mi-octobre	Site I	Site II	Site III	Site IV
T moyennne (°C)	20,4	20,4	20,0	20,0
T max (°C)	27,1	27,1	25,8	25,5
T min (°C)	13,7	13,7	14,7	13,0
Degré-jours cumulés (°C) [a]	2046	2046	2022	1990
Rainfall (mm)	290	290	274	220
Field characteristics & crop management				
Slope and orientation	5% N	0%	0%	0%
Sand (2-0.05 mm %)	38,9	25,0	35,7	32,6
Silt (0.05-0.002 mm %)	25,8	60,0	47,4	49,2
Clay (< 0.002 mm %)	35,3	15,0	14,5	16,1
pH(H_2O)	8,3	6,5	6,9	6,3
Organic matter (%)	1,7	2,5	2,6	2,1
Preceding crop	Fallow	Stevia	Fallow	Maize
Irrigation (mm)	20	10	160	120
Fertilization	None	None	None	None

[a] $\text{Degré} - \text{jours cumulés} = \sum_{\text{day}=1}^{\text{n}} \frac{\text{Tmax}+\text{Tmin}}{2} - \text{zéro de végétation}$; avec le zero de vegetation fixé à 6°C.

Des prélèvements de plantes ont été réalisés en fin de période végétative (V), au stade bouton floral (BF) et au stade floraison (F). Deux plantes par microparcelle ont été regroupées pour chaque prélèvement (n = 3 échantillons par génotype par stade de prélèvement sur chaque site). Le prélèvement au stade V a été réalisé à la même date, le 12 Août, pour tous les génotypes. Le prélèvement au stade BF a eu lieu le 28 Août pour les génotypes A et C, le 18 Septembre pour le génotype B. Le prélèvement au stade F a eu lieu le 02 Octobre pour les génotypes A et C et le 15 Octobre pour le génotype B. L'ensemble des plantes restantes (54 plantes / microparcelle) ont été récoltées au stade BF, afin de pouvoir établir un rendement à l'échelle de la parcelle : les plantes ont été regroupées par microparcelle sur chaque site (3 échantillons / génotype / site).

2.2. Mesures

2.2.1. Composantes du rendement

Pour chaque échantillon, la partie aérienne des plantes a été récoltée. Les feuilles et les tiges ont été séparées à la main et séchés à 40 ° C pendant 48 heures. Trois indicateurs de composantes du rendement ont été mesurés: la biomasse de la plante entière (feuilles + tiges ; g MS), la biomasse foliaire (g MS / plante), et *le leaf mass ratio* (LMR = biomasse foliaire/ biomasse totale, %). Pour les échantillons récoltés au stade BF, dans le but d'établir un rendement à la parcelle, les résultats ont été exprimés en kg MS / ha. A cette date de prélèvement une évaluation des symptômes foliaires de maladies des plantes a été réalisée à l'aide de deux indicateurs : fréquence, *i.e.* pourcentage de plantes atteintes, et intensité, *i.e.* pourcentage des feuilles atteintes sur les plantes.

2.2.2. Teneur et composition en glycosides de stéviol

L'extraction pour le dosage des SVglys a été faite à l'eau : pour chaque échantillon, 100 mg de feuilles de *S. rebaudiana* finement broyées ont été extraites dans 10 mL d'eau à 50°C pendant 30 min. Après centrifugation (7000 tours.min^{-1}, 10 min, 20°C) et filtration du surnageant (0,2 µm, *Regenerated cellulose membrane*, Sartorius, Allemagne), la solution résultante a été analysée en chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur ultraviolet (HPLC/UV) dont la longueur d'onde était fixée à 200 nm. Les SVglys ont été séparés sur une colonne de silice (C18) greffée en phase inverse (250 x 4,6 mm, 5µm ;

Luna C18 Phenomenex, USA). Ils ont été élués sous phase isocratique (31% H_2O - 69% acétonitrile acidifié à pH 2,6 avec de l'acide formique), à un débit de 1 $mL.min^{-1}$ pendant 30 min. Les SVglys ont été identifiés à l'aide d'un mélange de standards comprenant neuf SVglys : RD, RA, ST, RF, RC, DA, rubusoside, RB et stéviolbioside (JECFA Mixed Solution, Chromadex, USA). Sept SVglys ont été dosés : ST, RA, RF, RC, DA, RB et stéviolbioside (SVB). Le ST (Stévioside, standard primaire, Chromadex, USA) a été utilisé comme standard externe pour la quantification. Les résultats ont été exprimés en quantité par unité de masse sèche des feuilles pour la teneur totale en SVglys ($mg.g^{-1}$ MS) et en pourcentage de la teneur totale pour les proportions individuelles des SVglys. La quantité individuelle et totale des SVglys ont également été exprimées en moles ($\mu mol.g^{-1}$ MS).

2.2.3. Traitement des résultats

Le logiciel R.2.15.1 (R Core Team, 2013) a été utilisé pour effectuer les analyses statistiques. Une analyse de variance complète à trois facteurs (Lieu, Génotype, Bloc) a été utilisée pour déterminer l'effet du site d'expérimentation (*i.e.* conditions de croissance), du génotype et leurs interactions sur ll'intensité des symptômes foliaires de maladies et sur le rendement des plantes. Une analyse de variance complète à quatre facteurs (Lieu, Génotype, Stade, Bloc) a été utilisée pour déterminer l'effet du stade de développement, du site d'expérimentation, du génotype et leurs interactions sur l'élaboration de la biomasse, l'accumulation en SVglys et le rendement en SVglys. Les différences significatives entre les traitements ont été déterminées à l'aide du test HSD de Tukey (*Honestly Significant Difference*), du package AGRICOLAE. Le coefficient de corrélation *r* a été utilisé pour établir la relation entre la production de biomasse foliaire et le rendement en SVglys, entre les quantités de RA et de RB et entre les quantités de ST et de SVB.

3. RESULTATS

3.1. Evaluation des génotypes au stade bouton floral

3.1.1. Symptômes foliaires de maladies

La fréquence et l'intensité des symptômes foliaires de maladies sont variables selon le génotype et le site d'expérimentation (Tableau 10). Les symptômes sont les plus élevés pour le génotype A (fréquence = 100% et intensité ≥ 50% sur les quatre sites). Ils sont dans l'ensemble plus faibles pour les génotypes B et C. Pour ces deux génotypes, l'intensité et la fréquence des symptômes foliaires de maladies varie différemment selon le site d'essai (Tableau 10), suggérant des interactions génotype x environnement (IGE).

Tableau 10 : Intensité (%) et fréquence (%) des symptômes foliaires de maladies pour les plantes des génotypes A, B et C sur les sites I, II, III et IV au stade bouton floral.

Génotype	Lieu	Maladies	
		Fréquence	Intensité
A	I	100 ^{a}	50 ^{abc}
A	II	100 ^{a}	50 ^{abc}
A	III	100 ^{a}	73 ^{ab}
A	IV	100 ^{a}	50 ^{abc}
B	I	65 ^{b}	10 ^{e}
B	II	77 ^{ab}	5 ^{e}
B	III	80 ^{ab}	38 ^{cd}
B	IV	100 ^{a}	75 ^{a}
C	I	23 ^{c}	5 ^{e}
C	II	23 ^{c}	5 ^{e}
C	III	70 ^{ab}	20 ^{de}
C	IV	23 ^{c}	5 ^{e}

Les lettres après chaque valeur indiquent le résultat du test HSD de Tukey. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (risque d'erreur < 5%).

3.1.2. Evaluation du rendement

Le génotype, le site d'expérimentation et leur interaction ont un effet significatif sur l'élaboration du rendement. La biomasse foliaire (kg MS/ha) est significativement plus faible sur le site I pour les trois génotypes (Tableau 11). L'absence de différence significative de biomasse foliaire entre les trois génotypes sur ce site suggère qu'il est limitant pour la croissance des trois génotypes. Pour les trois génotypes, les conditions de croissance sur le site III sont favorables à l'élaboration de la biomasse foliaire. On observe des IGE sur les sites II et IV (Tableau 11). Les mêmes tendances sont observées pour le rendement en SVglys (kg/ha). Il y a en effet une corrélation positive (r = 0,95) entre la biomasse foliaire et le rendement en SVglys.

L'effet de l'environnement sur la teneur en SVglys est plus faible : il n'y a pas eu de différence significative de teneur en SVglys entre les plantes des différents sites pour les génotypes A et C (Tableau 11). Pour le génotype B, la teneur en SVglys est significativement plus élevée sur le site I par rapport au site IV, alors que le rendement foliaire y est significativement plus faible. Un effet de l'environnement sur la composition en SVglys est observé : le ratio RA/ST des génotypes A et C varie selon le site d'expérimentation (Tableau 11).

Tableau 11 : Valeurs moyennes des composantes du rendement au stade bouton floral selon le genotype (A, B et C) et le site d'expérience (I, II, III et IV).

Génotype	Lieu	Biomasse foliaire (kg MS/ha)	Teneur en SVglys (%)	Ratio RA/ST	Rendement en SVglys (kg/ha)	Rendement en RA (kg/ha)
A	I	1114 ^{e}	16.8 ^{ab}	0.52 ^{e}	187 ^{h}	55 ^{de}
A	II	2390 ^{d}	16.4 ^{ab}	0.56 ^{de}	391 ^{def}	121 ^{bc}
A	III	3609 ^{bc}	14.8 ^{abcd}	0.64 ^{cd}	537 ^{bcde}	172 ^{b}
A	IV	2685 ^{cd}	13.6 ^{bcd}	0.59 ^{de}	364 ^{efg}	111 ^{cd}
B	I	1788 ^{de}	15.3 ^{abc}	0.00 ^{f}	275 ^{fgh}	0 ^{e}
B	II	4183 ^{ab}	13.8 ^{bcd}	0.00 ^{f}	579 ^{abc}	0 ^{e}
B	III	4409 ^{ab}	12.8 ^{cd}	0.00 ^{f}	565 ^{abcd}	0 ^{e}
B	IV	3533 ^{bc}	11.4 ^{d}	0.00 ^{f}	405 ^{cdef}	0 ^{e}
C	I	1324 ^{e}	15.1 ^{abc}	0.63 ^{cde}	195 ^{gh}	64 ^{cd}
C	II	2741 ^{cd}	17.6 ^{a}	0.73 ^{bc}	482 ^{bcde}	173 ^{b}
C	III	4569 ^{a}	16.1 ^{abc}	0.87 ^{a}	737 ^{a}	292 ^{a}
C	IV	4028 ^{ab}	15.7 ^{abc}	0.83 ^{ab}	632 ^{ab}	237 ^{a}

Les lettres après chaque valeur indiquent le résultat du test HSD de Tukey. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (risque d'erreur < 5%).

3.2. Cinétique d'accumulation des glycosides de stéviol et élaboration de la biomasse

3.2.1. Elaboration de la biomasse

Le génotype, le site d'expérimentation, le stade de développement des plantes et leurs interactions ont eu un effet significatif sur l'élaboration de la biomasse (risque d'erreur < 0,1%). La biomasse de la plante augmente à chaque prélèvement, pour atteindre son maximum à la floraison (F) ou dès le stade bouton floral (BF) (Figure 28). Pour chacun des trois génotypes, au stade F, la biomasse la plus élevée est atteinte sur le site III. Sur ce site, l'augmentation de biomasse entre les stades V et BF est plus importante pour le génotype B que pour les génotypes A et C. Le stade BF a en effet été atteint 20 jours plus tard pour ce génotype. Le passage de la plante en phase reproductive induit une diminution de son LMR (%). Cet effet est particulièrement marqué entre les stades BF et F (Figure 28). Il en résulte, sur le site III, une biomasse foliaire plus élevée aux stades V et BF pour le génotype A, au stade BF pour les génotypes B et C. Sur les trois autres sites, il n'y a pas d'effet significatif du stade de développement sur la biomasse foliaire des génotypes A et B. Pour le génotype C, la biomasse foliaire maximale est atteinte au stade BF sur les sites II et IV.

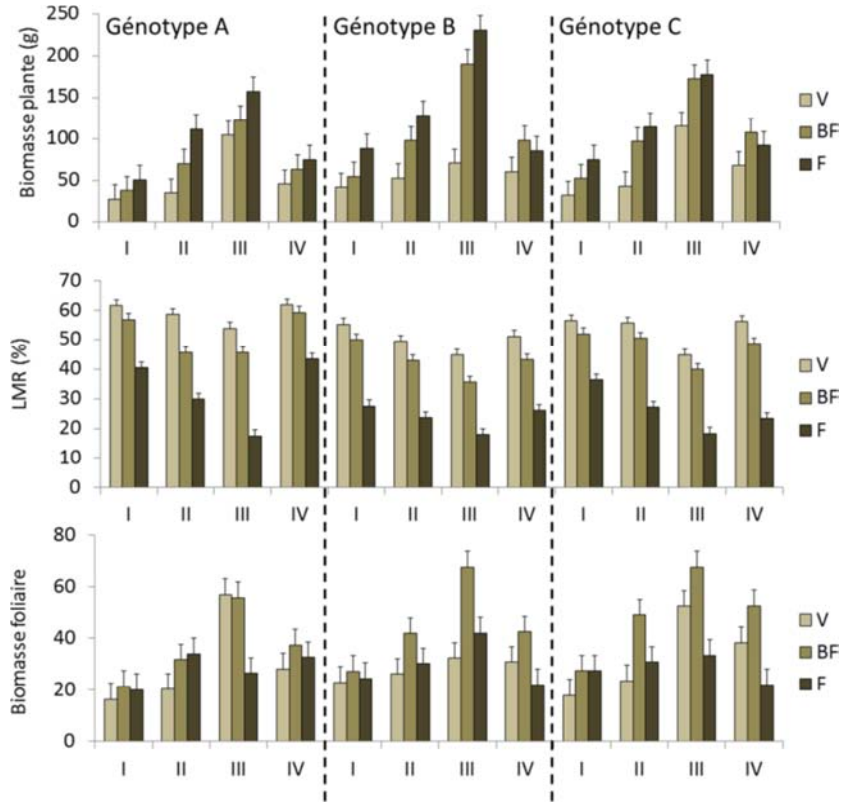


Figure 28 : Biomasse de la plante (g; moyenne ± SEM), LMR (leaf mass ratio, %; moyenne ± SEM) et biomasse foliaire (g/plante; moyenne ± SEM) des génotypes A, B et C sur les sites expérimentaux I, II, III et IV selon le stade de prélèvement.

V, végétatif ; BF, bouton floral ; F, floraison. L'erreur standard de la moyenne (SEM) a été calculée à partir du carré moyen de la résiduelle de l'analyse de variance.

3.2.2. Accumulation en glycosides de stéviol

Le génotype, le site d'expérimentation, le stade de développement des plantes et leurs interactions ont un effet significatif (risque d'erreur < 0,1%) sur la teneur en SVglys ($mg.g^{-1}$ MS). La teneur en SVglys diminue significativement à la floraison sur les sites I, III et IV pour le génotype A, sur le site IV pour les génotypes B et C (Figure 29). La teneur exprimée en quantité de masse sèche des feuilles peut varier selon la composition en glycosides de stéviol, dont les masses moléculaires varient. La transposition de cette variable en moles (Tableau 12) permet de considérer la quantité de noyaux de stéviol à l'entrée de la voie qui ont été glycosylés. Cette nouvelle unité de mesure permet d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus en $mg.g^{-1}$: la quantité de SVglys (µmol) a diminué significativement au stade F sur les sites I, III et IV pour le génotype A, sur le site IV pour les génotypes B (par rapport au stade BF seulement) et C.

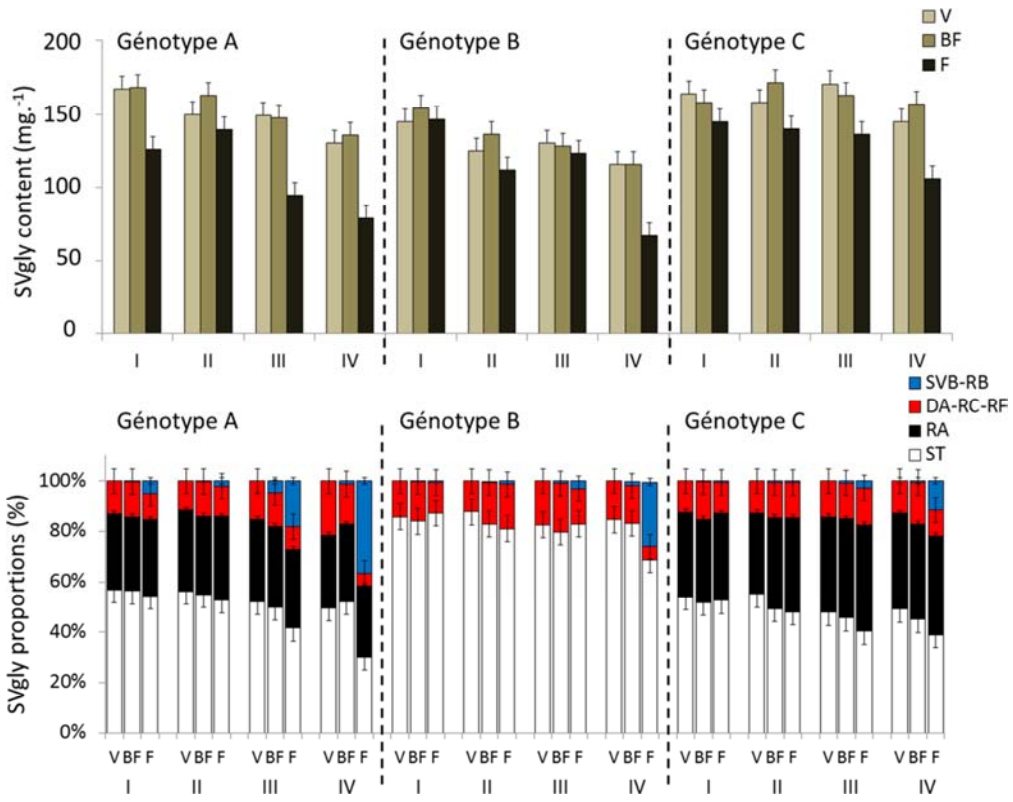


Figure 29 : Teneur en SVglys ($mg.g^{-1}$; moyenne ± SEM) et proportion individuelle des différents SVglys (%; moyenne ± SEM) des génotypes A, B et C sur les sites expérimentaux I, II, III et IV selon le stade de prélèvement.

V, végétatif ; BF, bouton floral ; F, floraison. L'erreur standard de la moyenne (SEM) a été calculée à partir du carré moyen de la résiduelle de l'analyse de variance.

Tableau 12 : Valeurs moyennes de la quantité totale (µmol) et quantité individuelles (µmol) des SVglys selon le genotype (A, B et C), le site d'expérience (I, II, III et IV) et le stade de développement (V, végéétatif ; BF, bouton floral ; F, floraison).

Génotype	Lieu	Stade	Quantité de SVglys (µmol)					Ratio	
			Total	RA	RB	ST	SVB	RA/ST	(RA+RB) / (ST+SVB)
A	I	V	195 ^{ab}	52 ^{ab}	0,0 ^{b}	118 ^{a}	0,0 ^{c}	0,44 ^{c}	0,44 ^{b}
	I	BF	197 ^{a}	51 ^{abc}	0,1 ^{b}	118 ^{a}	0,6 ^{c}	0,43 ^{c}	0,43 ^{b}
	I	F	149 ^{c}	39 ^{bcd}	1,8 ^{b}	85 ^{c}	7,2 ^{c}	0,47 ^{c}	0,45 ^{b}
	II	V	174 ^{abc}	50 ^{abc}	0,0 ^{b}	105 ^{abc}	0,0 ^{c}	0,48 ^{c}	0,48 ^{ab}
	II	BF	190 ^{ab}	53 ^{a}	0,2 ^{b}	112 ^{ab}	0,4 ^{c}	0,47 ^{c}	0,47 ^{ab}
	II	F	162 ^{abc}	48 ^{abc}	0,9 ^{b}	92 ^{abc}	2,6 ^{c}	0,52 ^{bc}	0,52 ^{ab}
	III	V	173 ^{abc}	51 ^{abc}	0,0 ^{b}	97 ^{abc}	0,0 ^{c}	0,52 ^{bc}	0,52 ^{ab}
	III	BF	173 ^{abc}	49 ^{abc}	2,7 ^{b}	92 ^{abc}	6,8 ^{c}	0,53 ^{bc}	0,52 ^{ab}
	III	F	113 ^{d}	30 ^{de}	6,4 ^{a}	48 ^{d}	18,7 ^{b}	0,63 ^{b}	0,55 ^{a}
	IV	V	152 ^{c}	39 ^{cd}	0,0 ^{b}	80 ^{c}	0,0 ^{c}	0,48 ^{c}	0,48 ^{ab}
	IV	BF	159 ^{bc}	43 ^{abc}	0,5 ^{b}	88 ^{bc}	2,0 ^{c}	0,49 ^{c}	0,48 ^{ab}
	IV	F	99 ^{d}	23 ^{e}	9,4 ^{a}	30 ^{d}	32,2 ^{a}	0,80 ^{a}	0,52 ^{ab}
C	I	V	190 ^{ab}	57 ^{ab}	0,0 ^{c}	110 ^{a}	0,0 ^{b}	0,52 ^{de}	0,52 ^{c}
	I	BF	183 ^{ab}	54 ^{ab}	0,1 ^{c}	102 ^{a}	0,6 ^{b}	0,53 ^{de}	0,52 ^{c}
	I	F	168 ^{ab}	52 ^{ab}	0,3 ^{c}	94 ^{ab}	0,7 ^{b}	0,55 ^{de}	0,55 ^{bc}
	II	V	184 ^{ab}	52 ^{ab}	0,0 ^{c}	108 ^{a}	0,0 ^{b}	0,50 ^{e}	0,50 ^{c}
	II	BF	197 ^{a}	64 ^{a}	0,3 ^{c}	105 ^{a}	0,6 ^{b}	0,61 ^{cde}	0,61 ^{bc}
	II	F	162 ^{abc}	54 ^{ab}	0,2 ^{c}	84 ^{ab}	0,8 ^{b}	0,65 ^{bcde}	0,64 ^{bc}
	III	V	196 ^{ab}	67 ^{a}	0,0 ^{c}	102 ^{a}	0,0 ^{b}	0,66 ^{bcde}	0,66 ^{bc}
	III	BF	186 ^{ab}	66 ^{a}	0,6 ^{bc}	91 ^{ab}	1,0 ^{b}	0,73 ^{abc}	0,73 ^{ab}
	III	F	156 ^{bc}	60 ^{ab}	1,8 ^{b}	69 ^{bc}	3,4 ^{b}	0,88 ^{a}	0,86 ^{a}
	IV	V	167 ^{abc}	57 ^{ab}	0,0 ^{c}	89 ^{ab}	0,0 ^{b}	0,64 ^{bcde}	0,64 ^{bc}
	IV	BF	180 ^{ab}	61 ^{a}	0,5 ^{bc}	87 ^{ab}	0,7 ^{b}	0,70 ^{abcd}	0,70 ^{ab}
	IV	F	124 ^{c}	43 ^{b}	4,6 ^{a}	51 ^{c}	13,1 ^{a}	0,84 ^{ab}	0,74 ^{ab}
Génotype	Lieu	Stade	Total			ST	SVB	ST+SVB	
B	I	V	180 ^{ab}			154 ^{abc}	0,0 ^{c}	154 ^{abc}	
	I	BF	191 ^{a}			161 ^{a}	0,4 ^{c}	161 ^{a}	
	I	F	183 ^{ab}			159 ^{ab}	1,1 ^{bc}	160 ^{ab}	
	II	V	155 ^{bc}			136 ^{abcd}	0,0 ^{c}	136 ^{bcd}	
	II	BF	170 ^{abc}			141 ^{abcd}	0,8 ^{c}	141 ^{abcd}	
	II	F	139 ^{c}			112 ^{d}	1,0 ^{bc}	113 ^{de}	
	III	V	162 ^{abc}			134 ^{bcd}	0,0 ^{c}	134 ^{bcd}	
	III	BF	159 ^{abc}			127 ^{cd}	1,9 ^{bc}	129 ^{cd}	
	III	F	154 ^{bc}			127 ^{cd}	5,5 ^{b}	132 ^{bcd}	
	IV	V	144 ^{c}			122 ^{d}	0,0 ^{c}	122 ^{d}	
	IV	BF	144 ^{c}			119 ^{d}	3,1 ^{bc}	122 ^{d}	
	IV	F	89 ^{d}			57 ^{e}	26,8 ^{a}	84 ^{e}	

Les lettres après chaque valeur indiquent le résultat du test HSD de Tukey. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (risque d'erreur < 5%).

En parallèle de la diminution de la quantité totale de SVglys (µmol) à la floraison, une diminution de la quantité de RA et de ST et une augmentation de la quantité de RB et de SVB sont généralement observées (Tableau 12). Une corrélation négative significative est observée entre les quantités de RA et de RB pour les génotypes A et C, et entre les quantités de ST et de SVB pour le génotype A seulement (Figure 30). Ces variations de composition en SVglys selon le stade de prélèvement n'ont généralement pas d'effet sur le ratio RA/ST, à l'exception du génotype A sur le site III. Pour ce dernier, le ratio (RA+RB) / (ST+SVB) reste néanmoins stable au fil des prélèvements (Tableau 12).

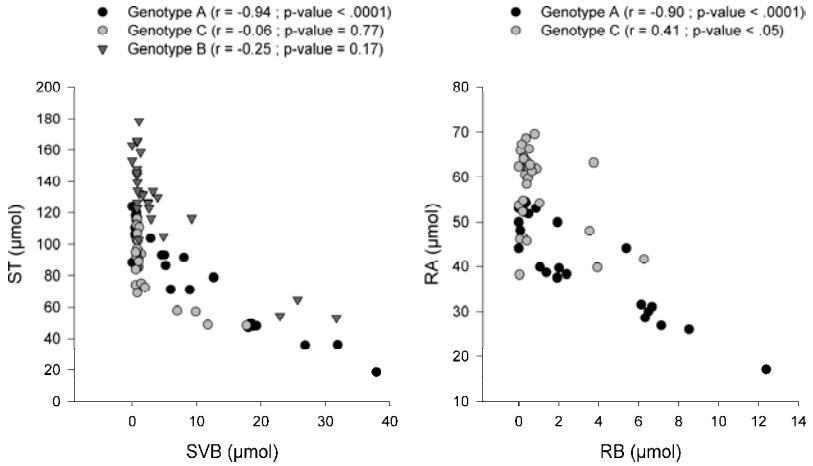


Figure 30 : Relation entre la quantité de ST (µmol) et la quantité de SVB (µmol) des génotypes A, B et C et relation entre la quantité de RA (µmol) et la quantité de RB (µmol) des génotypes A et C sur les sites expérimentaux I, II, III et IV aux stades bouton floral et floraison.

3.2.3. Rendement en glycosides de stéviol aux différents stades de prélèvement

Le génotype, le site d'expérimentation et le stade de développement des plantes ont un effet significatif (risque d'erreur < 0,1%) sur le rendement en SVglys (g / plante). Une seule interaction (lieu x stade) a un effet significatif sur le rendement. Sur les sites I et II, il n'y a pas d'effet du stade de prélèvement sur le rendement en SVglys (Figure 31). Sur les sites III et IV, le rendement est significativement plus faible au stade F pour les trois génotypes, et il n'y a généralement pas de différence significative entre les stades V et BF.

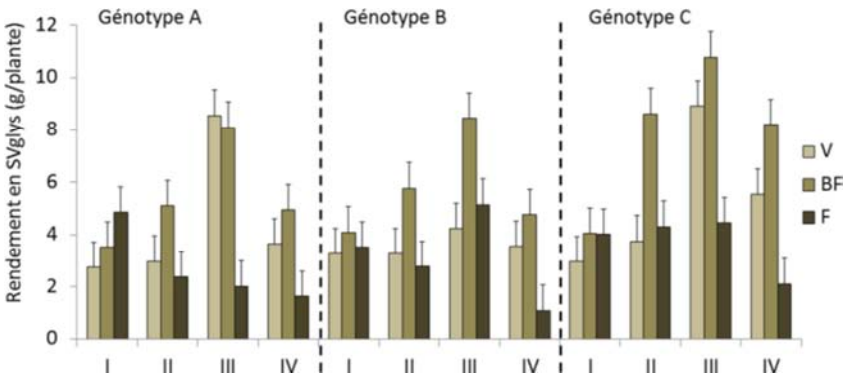


Figure 31 : Rendement en SVglys (g; moyenne ± SEM) des génotypes A, B et C sur les sites expérimentaux I, II, III et IV selon le stade de prélèvement (V, végétatif ; BF, bouton floral ; F, floraison).
L'erreur standard de la moyenne (SEM) a été calculée à partir du carré moyen de la résiduelle de l'ANOVA.

4. DISCUSSION

Des études ont montré l'effet de pratiques agronomiques sur l'élaboration du rendement de *S. rebaudiana* (Kumar R. *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2013; Serfaty *et al.*, 2013; Angelini et Tavarini, 2014; Kumar *et al.*, 2014). Néanmoins, seule une étude a été réalisée sur plusieurs génotypes (Andolfi *et al.,* 2006). Les résultats de notre étude montrent une variabilité de productivité des plantes selon l'environnement et le génotype, ainsi que des interactions génotype x environnement. Sur nos sites d'expérimentations, les conditions limitantes (site I) ne permettent pas d'observer de différence de productivité entre les trois génotypes, alors qu'ils se distinguent les uns des autres en conditions non-limitantes. L'élaboration du rendement (kg SVglys/ha) est principalement déterminée par la production de biomasse foliaire. Un objectif de sélection variétale et pour la définition des conditions de culture de *S. rebaudiana* doit donc être d'optimiser l'élaboration de la biomasse foliaire. Néanmoins, en conditions limitantes, une corrélation négative a été observée entre la teneur en SVglys et la production de biomasse foliaire. Ce résultat suggère une compétition entre les métabolismes primaire (élaboration de la biomasse) et secondaire (accumulation de SVglys) chez *S. rebaudiana*. Cette hypothèse sera discutée dans le chapitre 7 du présent manuscrit.

Les prélèvements à différents stades de développement permettent d'observer une augmentation de la biomasse foliaire jusqu'au stade BF, puis sa diminution. La teneur en SVglys est stable entre les stades V et BF. Elle stagne ou diminue ensuite, en accord avec les résultats discutés dans la littérature (Zaidan *et al.*, 1980 ; Bian, 1981 ; Vanidze *et al.*, 2009 ; Ceunen *et al.*, 2011). Ainsi, l'optimum de récolte est atteint au stade BF. Il n'y a pas d'effet de l'interaction génotype x stade sur le rendement en SVglys. Les dates de prélèvement plus tardives pour les stades BF et F du génotype B, et donc la longueur de jour, n'ont ainsi pas d'effet sur l'accumulation en SVglys au-delà de leur effet indirect d'induction de la phase reproductive.

Le déclin de la teneur en SVglys à la floraison est généralement accompagné d'une diminution de la quantité de RA et de ST et d'une augmentation de la quantité de RB et de SVB. Le SVB et le RB comprennent une unité de glucose de moins que le ST et le RA respectivement, au niveau du groupement carboxyl du noyau de stéviol (Figure 32). Ces résultats suggèrent une dégradation des SVglys, en accord avec l'hypothèse de catabolisme

des SVglys par des *β*-glycosidases endogènes (Madore, 2000). Les *β*-glycosidases endogènes des plantes ont en général pour rôle de libérer des composés volatiles, en réponse à une attaque par un herbivore par exemple (Dicke, 1994). La dégradation des SVglys par des *β*-glycosidases endogènes serait alors supposée libérer du stéviol. Dans une expérience, une légère augmentation de la quantité de rubusoside, RB, SVB et stéviolmonoside a été observée en parallèle d'une diminution de la teneur en SVglys. Néanmoins, aucune augmentation simultanée de la quantité de stéviol n'a pu être observée (Ceunen, 2010). Dans notre étude, le déclin de la teneur en SVglys et l'augmentation en parallèle de la quantité de RB et de SVB sont principalement observés sur des plantes présentant des symptômes foliaires de maladies importants (site IV, génotype A). Ainsi, la dégradation des SVglys pourrait également avoir lieu sous l'action de *β*-glycosidases exogènes d'origine bactérienne ou fongique, le glucose libéré étant une source de carbone pour la croissance de l'hôte pathogène (Oliveira *et al.*, 2013). Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour étudier ces hypothèses.

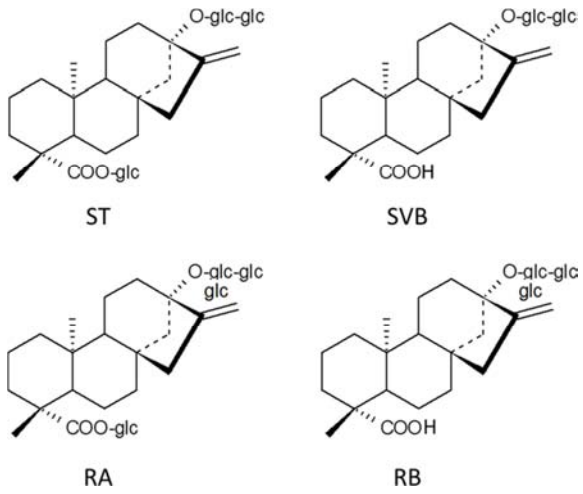


Figure 32 : Représentation schématique du stévioside (ST), du stéviolbioside (SVB), du rébaudioside A (RA) et du rébaudioside B (RB).

Malgré l'augmentation de la quantité de RB et de SVB avec la diminution de la quantité de SVglys, le ratio RA/ST des génotypes A et C est généralement resté stable au fil des prélèvements sur l'ensemble des sites d'expérience. Ainsi, comme discuté dans le chapitre 4, ces résultats suggèrent un déterminisme génotypique élevé pour la composition en SVglys et une activité des glycosyltransférases moins influencée par l'environnement que celle des enzymes intervenant avant la formation du stéviol dans la voie de biosynthèse des SVglys.

En conclusion, cette étude a montré une variabilité pout l'élaboration du rendement selon des facteurs génotypiques, ontogéniques et environnementaux. La biomasse foliaire est le premier facteur à prendre en compte pour l'élaboration du rendement final (kg SVglys/ha). Tant la production de biomasse que l'accumulation en SVglys sont influencées par le stade de développement des plantes, et l'optimum de récolte a été obtenu au stade BF. La composition en SVglys est moins influencée par ces facteurs environnementaux et ontogéniques. Cette étude n'a été réalisée que sur année et mériterait d'être reconduite sur plusieurs années afin d'évaluer l'évolution de la productivité des génotypes, en vue d'une culture pluriannuelle de *S. rebaudiana*.

Conclusion de la Partie 2

CONCLUSION DE LA PARTIE 2

Les résultats présentés dans cette partie ont permis d'identifier une variabilité suffisante entre les génotypes pour établir des distinctions sur des critères morphologiques, de sensibilité aux maladies et de précocité, en vue de l'évaluation variétale de *S. rebaudiana*. Un travail plus approfondi est dorénavant nécessaire, afin de décrire avec précision des caractères permettant de vérifier les critères d'homogénéité et de stabilité.

Une variabilité génotypique élevée a été observée pour la production de biomasse foliaire, la teneur et la composition en SVglys. L'élaboration de la biomasse et la teneur en SVglys sont également apparues influencées par des facteurs ontogénétiques, environnementaux (conditions de croissance et âge de la plante) et par des interactions génotype x environnement. A l'inverse, la composition en SVglys est restée relativement stable au travers des différents environnements et stades phénologiques, suggérant un déterminisme génotypique plus élevé pour ce trait. Les environnements ici étudiés sont néanmoins peu contrastés. L'optimum de récolte, fortement corrélé à la production de biomasse foliaire, a systématiquement été obtenu au stade bouton floral. Ainsi, en vue d'un travail de sélection, la production de biomasse foliaire au stade bouton floral est un critère à améliorer. Compte-tenu de la robustesse de la composition en SVglys, ce critère peut également être retenu dans les objectifs de sélection. Par ailleurs, l'accumulation en SVglys a généralement été plus élevée dans les plantes de deux ans, soulignant l'intérêt d'une culture semi-pérenne de *S. rebaudiana* lorsque le climat le permet.

L'augmentation de la quantité de SVB et de RB avec le déclin de la teneur totale à la floraison, et la corrélation négative obtenue entre SVB et ST et RB et RA, suggère une dégradation des SVglys à la floraison, en accord avec l'hypothèse de catabolisme des SVglys par des β-glycosidases (Madore, 2000). Le dosage de SVglys moins glycosylés, tels que le steviomonoside, et du stéviol n'ont cependant pas été réalisés.

La corrélation négative qui a été observée entre la teneur totale en SVglys et la production de biomasse foliaire suggère une compétition entre les métabolismes primaire et secondaire chez *S. rebaudiana*. Une approche écophysiologique est nécessaire pour mieux appréhender les mécanismes d'élaboration du rendement chez *S. rebaudiana*. Ainsi, la troisième partie de ce manuscrit a pour objectif d'étudier l'effet de facteurs environnementaux et ontogénétiques sur l'élaboration de la biomasse et l'accumulation en SVglys, par des expérimentations à l'échelle de la plante et de la feuille réalisées en conditions contrôlées.

PARTIE 3. CONDUITE AGRONOMIQUE ET ANALYSE ECOPHYSIOLOGIQUE

Introduction de la Partie 3

INTRODUCTION DE LA PARTIE 3

La productivité des plantes de *S. rebaudiana* dépend de l'élaboration de la biomasse foliaire et de l'accumulation en SVglys dans les feuilles. Cette dernière varie selon le génotype considéré, mais peut être aussi largement influencée par des facteurs ontogéniques (stade de développement, âge de la feuille) et environnementaux (longueur de jour, intensité lumineuse, température, eau, nutriments, etc.). La teneur en SVglys dans les feuilles de *S. rebaudiana* peut ainsi varier entre 4 et 20% de la masse sèche des feuilles selon ses conditions de croissance (Metivier et Viana, 1979 ; Geuns, 2003). Les SVglys sont issus de la voie du MEP. Cette voie permet également la synthèse des pigments photosynthétiques (chlorophylles, caroténoïdes) et d'hormones (gibbérellines, acide abscissique) (Cordoba *et al.*, 2011). Compte-tenu des teneurs élevées auxquelles sont accumulés les SVglys dans les feuilles de *S. rebaudiana*, leur voie de biosynthèse doit nécessiter une quantité importante de substrats et d'enzymes et pourrait être en concurrence avec la synthèse d'autres produits de la voie du MEP, favorisant la croissance de la plante, telles que les gibbérellines ou les chlorophylles (Guleria *et al.*, 2014).

L'objectif de cette partie est de caractériser l'effet de facteurs environnementaux et ontogénétiques clé sur l'élaboration de la biomasse chez *S. rebaudiana* et sur la teneur et la composition en glycosides de stéviol, afin de pouvoir proposer des itinéraires techniques pour sa culture en milieu tempéré. Les résultats de cette partie sont également discutés d'un point de vue écophysiologique, afin de mieux appréhender le fonctionnement de la plante pour l'élaboration de son rendement : croissance (métabolisme primaire) et accumulation en glycosides de stéviol (métabolisme secondaire). Les facteurs étudiés dans le chapitre 6 sont le stade de développement des plantes, la longueur de jour et l'âge de la feuille. Un génotype a été étudié lors de deux expérimentations en conditions contrôlées. Les conditions expérimentales ont permis de distinguer les effets du stade de développement et de la longueur de jour. Le chapitre 7 a permis d'étudier l'effet de la fertilisation et du statut azoté des plantes sur l'accumulation de la biomasse et des SVglys. Deux génotypes ont été étudiés en conditions contrôlées, semi-contrôlées et en plein champ. Les résultats de ce chapitre ont été valorisés sous forme d'une publication scientifique : « Nitrogen limitation alters biomass production but enhances steviol glycoside concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni » Claire Barbet-Massin, Simon Giuliano, Lionel Alletto, Jean Daydé and Monique Berger ; *Plos One* (accepté).

Chapitre 6. Cinétique d'accumulation des glycosides de stéviol selon le stade de développement, l'âge de la feuille et la longueur de jour

1. INTRODUCTION

L'optimum de récolte de *S. rebaudiana* est généralement défini au stade bouton floral. Il est en effet admis que la teneur en SVglys dans les feuilles augmente progressivement jusqu'à la formation des bourgeons floraux (Bondarev *et al.*, 2003 ; Ceunen et Geuns, 2013c ; Yang *et al.*, 2015), puis a ensuite tendance à stagner ou à décroître (Zaidan *et al.*, 1980 ; Bian, 1981 ; Vanidze *et al.*, 2009 ; Ceunen *et al.*, 2011). *S. rebaudiana* étant une plante de jours courts, l'induction de la floraison a lieu avec le déclin de la durée du jour. Deux phénomènes distincts, liés à la photopériode ou au stade de développement de la plante, peuvent alors avoir lieu.

Premièrement, l'énergie dédiée à la voie de biosynthèse des SVglys pourrait dépendre de l'activité photosynthétique des feuilles. Une étude a en effet montré une teneur en SVglys de 45% plus élevée dans les feuilles de plantes conduites sous jours longs (16 h) que dans les feuilles de plantes conduites sous jours courts (8 h) (Metivier et Viana, 1979). En parallèle, la fixation nette de carbone et la masse sèche des feuilles étaient également plus élevées sous jours longs. Ces résultats suggèrent un détournement des produits de la photosynthèse vers la voie de biosynthèse des SVglys plus sensible sous jours longs que sous jours courts. Selon cette hypothèse, sous nos climats septentrionaux, la diminution de la durée du jour à la fin de l'été entraînerait un déclin de la teneur en SVglys à l'échelle de la plante, à mesure que de nouvelles feuilles se développeraient sous jours courts.

Comme évoqué dans le chapitre 5, le déclin de la teneur en SVglys à la floraison pourrait également être lié à leur transport vers les organes reproductifs (Bondarev *et al.*, 2003), à leur dégradation par des β-glycosidases endogènes (Madore, 2000) ou à leur pouvoir antioxydant : ils seraient dégradés par des espèces réactives de l'oxygène (Ceunen et Geuns, 2013a).

Des résultats contradictoires ont été obtenus quant aux effets séparés de la photopériode et du stade de développement sur la voie de biosynthèse des SVglys et leur accumulation. Des plantes maintenues au stade végétatif sous des conditions de jours courts (8 h et interruption la nuit par de la lumière rouge LED (660 nm) pendant cinq minutes) ont présenté, après sept semaines d'expérience, une teneur en SVglys deux fois plus élevée que les plantes maintenues en jours courts et dont l'induction florale a été provoquée. La teneur en SVglys des plantes conduites en jours longs (16h) n'était quant à elle pas significativement différente de la teneur

obtenue pour les plantes conduites avec le traitement à la lumière rouge (Ceunen *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que l'accumulation en SVglys est principalement influencée par le stade de développement. Cependant, d'autres expériences ont montré un effet de la photopériode sur l'accumulation en SVglys au-delà de son effet indirect d'induction de la phase reproductive. Ceunen et Geuns (2013c) ont conduit des plantes entièrement sous jours courts (8h) ou sous jours longs (16h), du stade végétatif à la floraison. En fin de période végétative, la teneur en SVglys était de 30% plus élevée dans les plantes conduites en jours courts que dans les plantes conduites en jours longs (6,9% *vs.* 5,3%). Un déclin de la teneur en SVglys a été observé pendant la période reproductive en conditions de jours courts principalement (Ceunen et Geuns, 2013c). A l'opposé, dans l'étude de Métivier et Viana (1979), la teneur en SVglys était deux fois plus élevée en conditions de jours longs qu'en conditions de jours courts en fin de période végétative.

L'effet de la photopériode et du stade de développement sur la composition en SVglys semble moins marqué. Pour les plantes conduites en jours longs, la composition paraît rester relativement stable, quel que soit l'étage foliaire considéré et le stade de développement (Mohamed *et al.*, 2011 ; Ceunen et Geuns, 2013c). Sous jours courts, des variations ont été observées : dans l'étude de Mohamed *et al.* (2011), un ratio RA/ST plus élevé dans les jeunes feuilles a été noté. Les résultats de Ceunen et Geuns (2013c) montrent quant à eux un ratio RA/ST plus élevé au stade végétatif qu'en phase reproductive, pour l'ensemble des étages foliaires.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les effets distincts du stade de développement et de la longueur sur l'accumulation en SVglys et l'élaboration de la biomasse. L'effet de l'âge de la feuille et des conditions photopériodiques sous lesquelles elle a été initiée et s'est développée, a également été étudié. Un génotype a été étudié au cours de deux expériences en conditions contrôlées (CC ; Essai 1 et Essai 2). Trois traitements photopériodiques ont été appliqués aux plantes: (i) jours longs, (ii) jours courts et (iii) jours courts puis jours longs. Les plantes sous jours longs sont restées au stade végétatif pendant toute la durée de chaque expérience, alors que les autres traitements photopériodiques ont entraîné le passage des plantes en phase reproductive.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Les expériences ont été réalisées sur le génotype A, qui a été étudié sur l'ensemble des expériences réalisées au cours des trois années de thèse. La composition en SVglys de ce génotype est bien connue : il contient du ST, du RA et des SVglys mineurs (DA, RC, RF). Les plantes utilisées dans les expériences présentées ici ont été obtenues à partir de boutures réalisées sur des pieds-mères de deux ans.

2.2. Conditions de croissance

Les deux expériences (Essai 1 et Essai 2) ont été réalisées en chambre de culture, dont l'éclairage était fourni par des lampes à vapeur de sodium sous haute pression (SHP, 200 W) et des lampes aux halogénures (MH, 200 W). Le rayonnement photosynthétiquement actif (PAR, photosynthetically active radiation) est de 400 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ au niveau des plantes. La chambre de culture a été divisée en deux compartiments. La durée du jour dans le premier compartiment était de 16 h (conditions de jours longs, LD). Dans le deuxième compartiment, elle était de 8 h (conditions de jours courts, SD). Dans les deux compartiments la température de l'air était de 23°C le jour et de 18°C la nuit et l'humidité relative oscillait autour de 70%. L'Essai 1 a été réalisé dans le courant de l'été 2014 et l'Essai 2 a eu lieu à l'automne 2014.

Avant le démarrage des essais, les plantes ont été maintenues en conditions de jours longs en chambre de culture, jusqu'au stade 4/5 feuilles. Elles ont ensuite été réparties en trois traitements au démarrage de chacun des essais : T1, les plantes cultivées en LD durant toute la durée de l'expérience (45 jours pour l'essai 1 ; 28 jours pour l'essai 2) ; T2, les plantes transférées en SD au démarrage de l'expérience ; T3, les plantes transférées en SD au démarrage de l'expérience et re-transférées en LD après deux semaines. Les plantes du traitement T1sont restées au stade végétatif pendant toute la durée de l'expérience, alors que les traitements T2 et T3 ont provoqué l'induction florale.

2.3. Prélèvements et mode d'échantillonnage

2.3.1. Essai 1

Quatre prélèvements ont été réalisés : S1 (*i.e.* Sampling 1, jour 0), S2 (jour 15), S3 (jour 30 ; stade bouton floral atteint pour les plantes des traitements T2 et T3) et S4 (jour 45 ; stade floraison atteint pour les plantes des traitements T2 et T3). Chaque prélèvement a été opéré sur cinq plantes par traitement. Pour chaque plante, les tiges, les feuilles et les bractées ont été récoltées. Les feuilles ont été regroupées selon leur âge (*i.e.* par étage foliaire), pour former trois à six échantillons par plante par prélèvement (Figure 33). Les trois niveaux de feuilles représentés en vert foncé sur la figure correspondent à des feuilles ayant le même âge physiologique à chaque prélèvement : feuilles matures pour le niveau le plus bas, feuilles entièrement développées pour le niveau intermédiaire et feuilles en cours de développement pour le niveau le plus haut. A chaque prélèvement (S1-S4), il y a eu entre 4 et 8 échantillons / plante / traitement (T1-T3) : 1 échantillon « tiges » + 0 à 1 échantillon « bractées » + 3 à 6 échantillons « feuilles ».

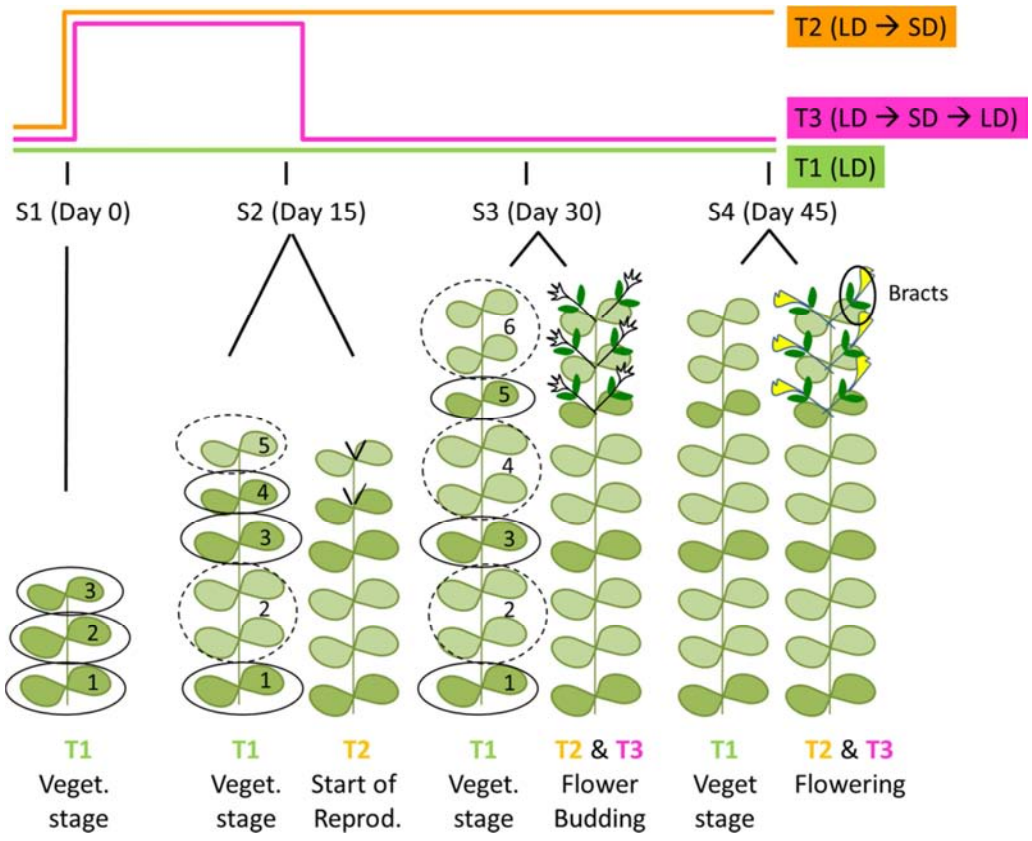


Figure 33 : Représentation schématique des différents prélèvements (S1 à S4), du stade de développement de plantes à chaque prélèvement selon le traitement (T1 à T3), et du mode d'échantillonnage (3 à 6 étages foliaires, bractées et tiges également prélevées).
LD, long days (jours longs); SD, short days (jours courts).

2.3.2. Essai 2

Quatre prélèvements ont été réalisés : S1 (*i.e.* Sampling 1, jour 0), S2 (jour 14), S3 (jour 21), S4 (jour 28). Chaque prélèvement a été opéré sur trois plantes par traitement. Seules les feuilles d'une tige ont été prélevées. Elles ont été regroupées selon leur âge (*i.e.* par étage foliaire), pour former trois à huit échantillons par plante par prélèvement (Figure 34). Ainsi, à chaque prélèvement (S1-S4), il y a eu entre 3 et 8 échantillons / plante / traitement (T1-T3).

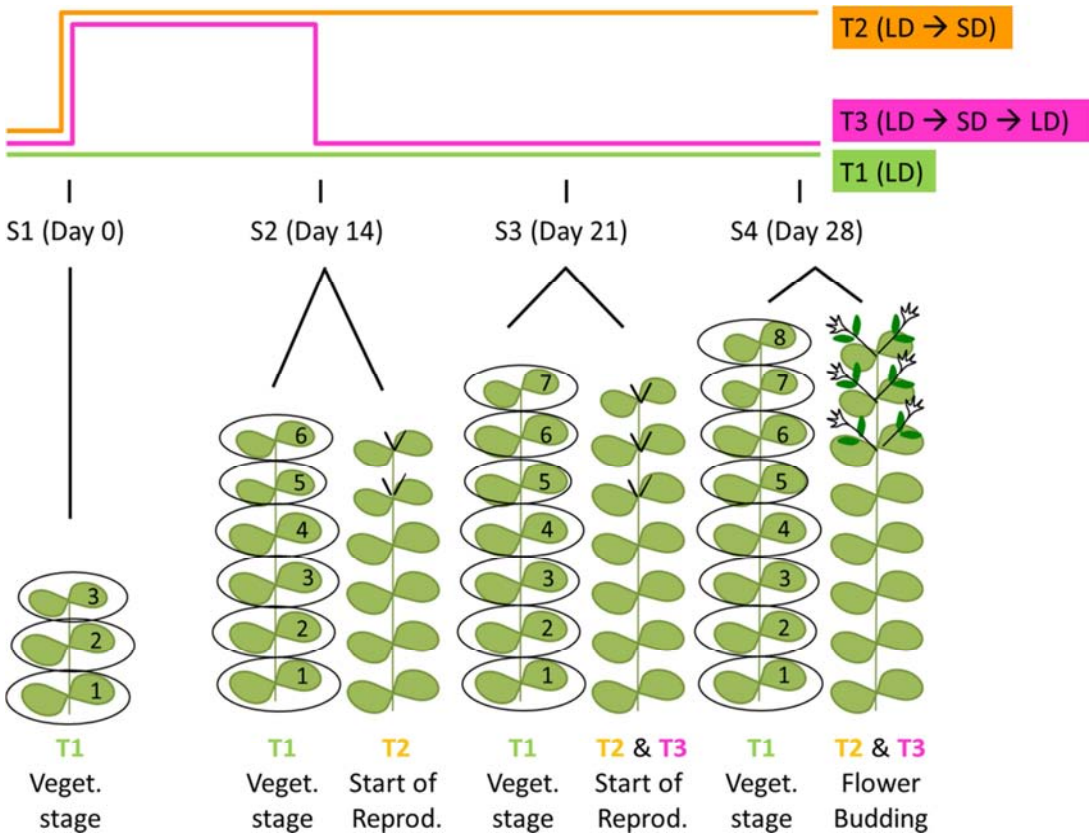


Figure 34 : Représentation schématique des différents prélèvements (S1 à S4), du stade de développement de plantes à chaque prélèvement selon le traitement (T1 à T3), et du mode d'échantillonnage (3 à 8 étages foliaires).
LD, long days (jours longs); SD, short days (jours courts).

2.4. Mesures

2.4.1. Elaboration de la biomasse

Ces mesures ont été réalisées sur les plantes de l'Essai 1 seulement. Pour chaque échantillon « feuilles », la surface et la masse des feuilles ont été mesurées. Les données de surfaces foliaires ont été acquises au moyen d'un Li-Cor 3100C Area meter (précision 1 mm^2 ; Li-Cor, Lincoln, NE, USA). La masse des échantillons « tiges » et « bractées » a

également été établie. L'ensemble de ces mesures ont permis d'obtenir l'ensemble des paramètres suivants : masse foliaire par unité de surface foliaire (*leaf mass per unit leaf area*, LMA, $g.m^{-2}$), biomasse de la plante (feuilles + tiges ; g MS), biomasse foliaire (g MS / plante), leaf mass ratio (LMR, %). Des mesures de hauteur des plantes (mm) et de longueur des entre-nœuds de la tige principale (mm) ont également été réalisées.

2.4.2. Teneur et composition en glycosides de stéviol

L'extraction pour le dosage des SVglys a été faite à l'eau : pour chaque échantillon, 50 mg de feuilles de *S. rebaudiana* finement broyées ont été extraites dans 5 mL d'eau à 50°C pendant 30 min. Après centrifugation (7000 $tours.min^{-1}$, 10 min, 20°C) et filtration du surnageant (0,2 µm), la solution a été analysée en chromatographie liquide haute performance (HPLC/UV) dont la longueur d'onde était fixée à 200 nm. Les SVglys ont été séparés sur une colonne de silice (C18) greffée en phase inverse (250 x 4,6 mm, 5 µm particle size ; Luna C18 Phenomenex, USA). Ils ont été élués sous phase isocratique (31% H_2O - 69% acétonitrile acidifié à pH 2,6 avec de l'acide formique), à un débit de 1 $mL.min^{-1}$ pendant 30 min. Les SVglys ont été identifiés à l'aide d'un mélange de standards comprenant neuf SVglys : RD, RA, ST, RF, RC, DA, rubusoside, RB et stéviolbioside (SVB) (JECFA Mixed Solution, Chromadex, USA). Cinq SVglys ont été dosés dans le cadre de l'Essai 1 : ST, RA, RF, RC, DA, et sept dans le cadre de l'Essai 2 : ST, RA, RF, RC, DA, RB et SVB. Le ST a été utilisé comme standard externe pour la quantification. Les résultats ont été exprimés en quantité par unité de masse sèche des feuilles pour la teneur totale en SVglys ($mg.g^{-1}$ MS) et en pourcentage de la teneur totale pour les proportions individuelles des SVglys. Les quantités individuelle et totale des SVglys ont également été exprimées en moles ($\mu mol.g^{-1}$ MS).

2.5. Traitement des résultats

Le logiciel R.2.15.1 (R Core Team, 2013) a été utilisé pour effectuer les analyses statistiques. Une analyse de variance complète à trois facteurs (Prélèvement, Traitement, Etage foliaire) a été utilisée pour déterminer l'effet du stade de développement, de la longueur de jour, de l'âge de la feuille et leurs interactions sur l'accumulation en SVglys. Une analyse de variance complète à deux facteurs (Prélèvement et Traitement) a été utilisée pour déterminer l'effet de la longueur de jour et du stade de développement sur l'élaboration de la biomasse. Les différences significatives entre les traitements ont été déterminées à l'aide du test HSD de Tukey (honestly significant difference), du package AGRICOLAE.

3. RESULTATS

3.1. Accumulation en glycosides de stéviol

3.1.1. Teneur totale en glycosides de stéviol

Au cours des deux expériences, la durée du jour, la date de prélèvement, l'étage foliaire et leurs interactions ont un effet significatif sur la teneur en SVglys (µmol.g^{-1} MS). Les regroupements d'étages foliaires lors de l'Essai 1 (Figure 35) ne permettent d'observer que des tendances d'évolution d'accumulation en SVglys dans le temps selon l'âge de la feuille et la longueur de jour sous laquelle elle s'est développée. Au cours de l'Essai 2 (Figure 36), les prélèvements réalisés individuellement pour chaque étage foliaire permettent de suivre précisément l'évolution dans le temps de l'accumulation en SVglys.

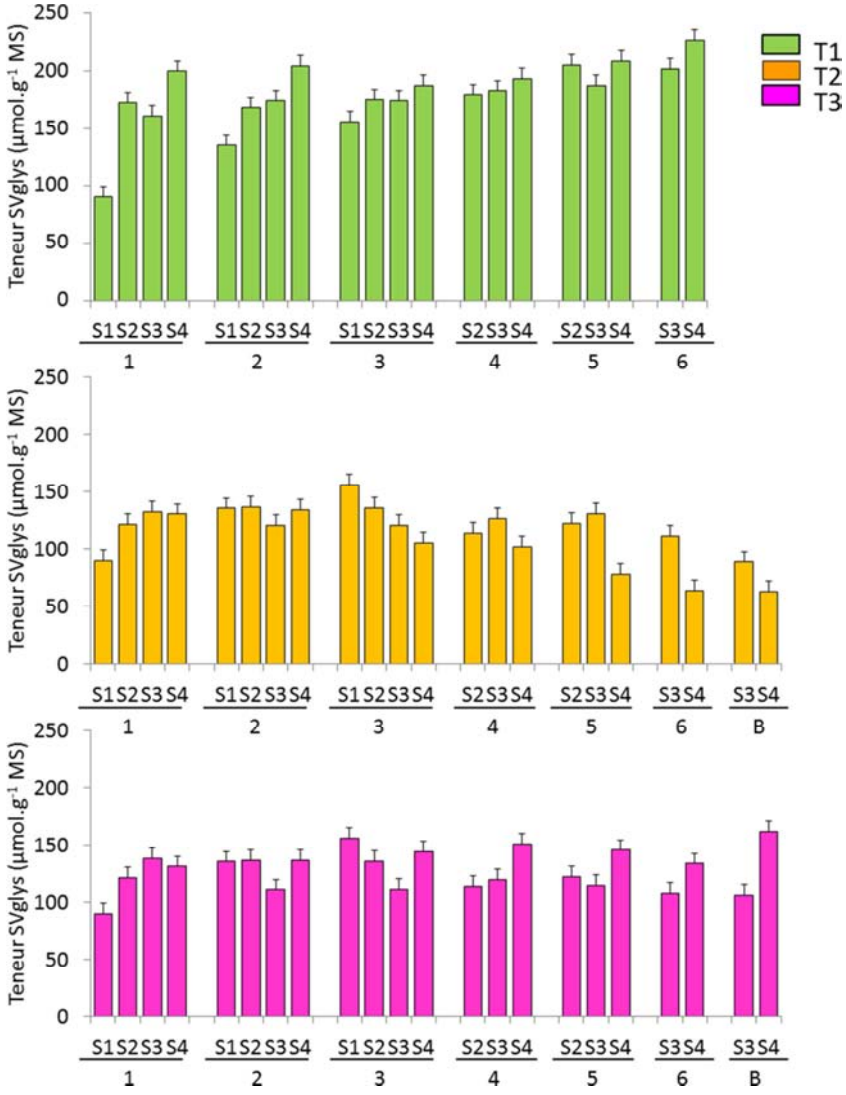


Figure 35: Teneur en SVglys (µmol.g^{-1}; moyenne ± SEM) du génotype A lors de l'essai 1, selon le traitement photopériodique (T1, T2 et T3), l'étage foliaire (1 à 6 ; B, bractées) et la date de prélèvement (S1, J0 ; S2, J15 ; S3, J30 ; S4, J45).
L'erreur standard de la moyenne (SEM) a été calculée à partir du carré moyen de la résiduelle de l'analyse de variance.

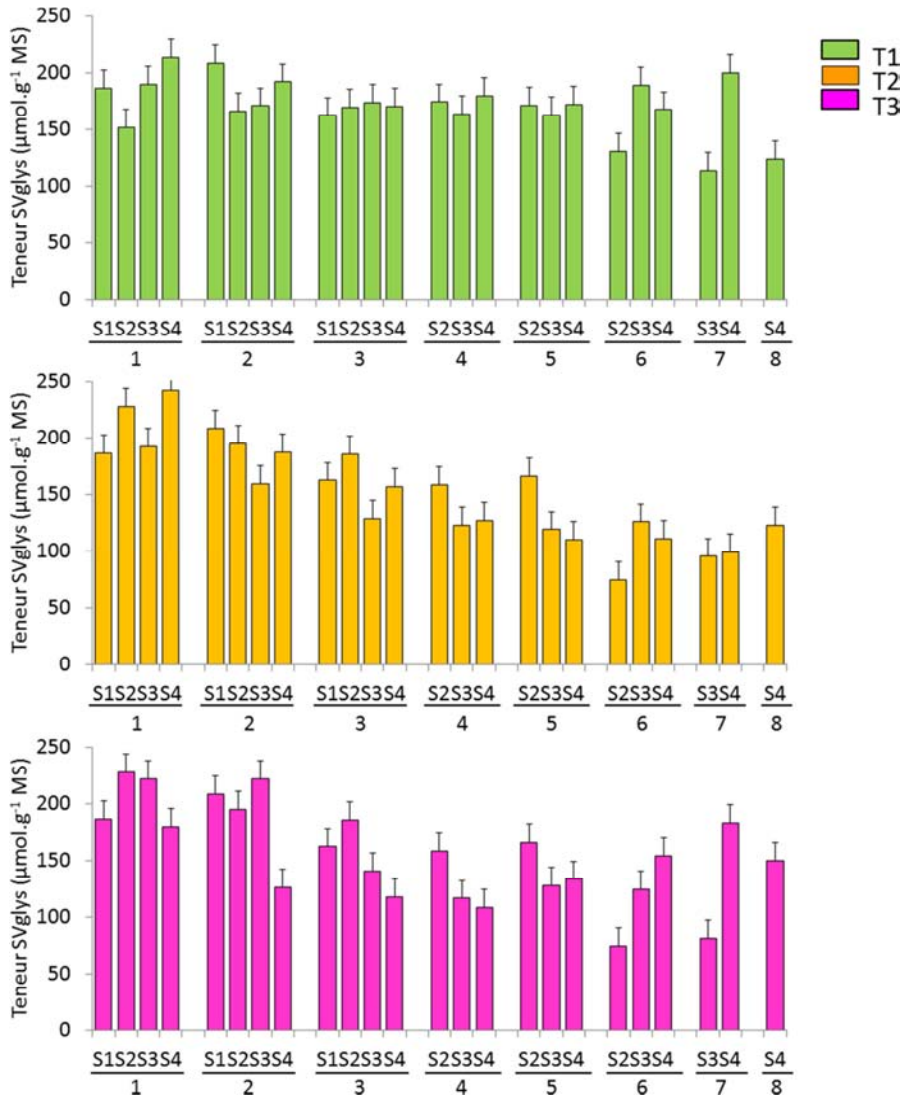


Figure 36 : Accumulation en SVglys (µmol.g^{-1} ; moyenne ± SEM) lors de l'Essai 2, selon le traitement photopériodique (T1, T2 et T3), l'étage foliaire (1 à 8) et la date de prélèvement (S1, J0 ; S2, J14 ; S3, J21 ; S4, J28).

L'erreur standard de la moyenne (SEM) a été calculée à partir du carré moyen de la résiduelle de l'analyse de variance.

Les résultats de l'Essai 1 montrent une accumulation en SVglys plus forte sous T1 que sous T2 et T3 pour tous les étages foliaires (Figure 35), alors qu'au cours de l'Essai 2, ce phénomène est observé pour les feuilles les plus jeunes (étages foliaires 3 à 7) seulement (Figure 36). En effet, lors de l'Essai 1, la teneur en SVglys des feuilles âgées (étages foliaires 1 et 2 ; initiation et développement sous jours longs) augmente significativement au fil des prélèvements sous T1 alors qu'elle reste stable sous T2 et T3. Lors de l'Essai 2, la teneur en SVglys à ces étages foliaires reste stable au fil des prélèvements sous tous les traitements.

Pour les étages foliaires supérieurs, la teneur en SVglys est stable au fil des prélèvements sous le traitement T1 lors de l'Essai 1 (Figure 35). Lors de l'Essai 2, elle augmente entre S2 et S3 pour l'étage foliaire 6, puis est stable entre S3 et S4. Elle augmente entre S3 et S4 pour l'étage foliaire 7 (Figure 36). Il n'y a qu'une semaine entre ces différents prélèvements. Cela suggère que l'activation et la mise en place de la voie est progressive et que le potentiel d'accumulation en SVglys de la feuille est atteint en une semaine environ. Ce même phénomène est observé avec une amplitude plus ou moins forte sous T2 (étage foliaire 6) et sous T3 (étages foliaires 6 et 7) (Figure 36).

Pour les feuilles les plus jeunes, l'accumulation en SVglys n'est pas la même sous T2 et sous T3. Lors du prélèvement S4 de l'essai 1, une diminution significative de la teneur en SVglys est observée pour les échantillons 3 à 6 ainsi que pour les bractées sous T2, alors qu'une augmentation est obtenue sous T3 (Figure 35). Ces résultats peuvent être liés au regroupement des étages foliaires. Lors de l'Essai 2, en effet, la teneur en SVglys est globalement stable au fil des prélèvements sous T2 (à l'exception de l'étage foliaire 6 ; Figure 36). Sous T3, il n'y a pas d'augmentation significative de la teneur en SVglys entre S3 et S4 pour les feuilles initiées et/ou développées sous jours courts (3, 4, 5, 6), mais une augmentation significative de la teneur est observée à l'étage foliaire 7 (initiation et développement sous jours longs) (Figure 36).

3.1.2. Composition en glycosides de stéviol

Au cours des deux expériences et pour l'ensemble des plantes, il n'y a pas d'évolution significative du ratio RA/ST entre les différents étages foliaires et au fil des prélèvements (Tableau 13). La proportion des SVglys mineurs (DA+RC+RF) est également relativement stable entre les traitements, dates de prélèvement et étages foliaires. Les proportions de SVB et RB sont très faibles (< 0,5%) à tous les étages foliaires et sous tous les traitements (Figure 37).

Tableau 13: Valeurs moyennes du ratio RA/ST du génotype A lors des essais 1 et 2, selon le traitement photopériodique (T1, T2 & T3), l'étage foliaire (1 à 6 et bractées pour l'Essai 1 ; 1 à 8 pour l'Essai 2) et la date de prélèvement (S1, S2, S3 et S4).

Traitement	Etage foliaire	Essai 1				Essai 2			
		S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
T1	1	0,79 abc	0,65 cdefg	0,68 cdef	0,74 cde	0,43 abcde	0,43 abcde	0,47 abcde	0,58 abcd
T1	2	0,63 cdefg	0,61 cdefg	0,63 cdefg	0,58 cdefg	0,37 bcde	0,41 bcde	0,41 bcde	0,49 abcde
T1	3	0,57 cdefg	0,52 cdefg	0,53 cdefg	0,46 efg	0,42 abcde	0,42 abcde	0,42 abcde	0,52 abcde
T1	4		0,49 defg	0,48 defg	0,48 defg		0,46 abcde	0,45 abcde	0,55 abcde
T1	5		0,48 defg	0,47 defg	0,50 defg		0,46 abcde	0,45 abcde	0,54 abcde
T1	6			0,53 cdefg	0,52 cdefg		0,51 abcde	0,47 abcde	0,60 abc
T1	7							0,54 abcde	0,61 abc
T1	8								0,63 ab
T2	1		0,53 cdefg	0,56 cdefg	0,63 cdefg		0,36 cde	0,48 abcde	0,37 cde
T2	2		0,55 cdefg	0,50 defg	0,52 cdefg		0,33 de	0,41 bcde	0,40 bcde
T2	3		0,41 fg	0,46 efg	0,49 defg		0,43 abcde	0,38 bcde	0,47 abcde
T2	4		0,38 g	0,46 efg	0,53 cdefg		0,37 cde	0,34 de	0,45 abcde
T2	5		0,43 fg	0,50 defg	0,62 cdefg		0,37 cde	0,32 e	0,51 abcde
T2	6			0,57 cdefg	0,73 cde		0,43 abcde	0,31 e	0,56 abcde
T2	7							0,34 de	0,50 abcde
T2	B / 8			0,54 cdefg	0,58 cdefg				0,50 abcde
T3	1			0,68 cdef	0,68 cdef			0,45 abcde	0,43 abcde
T3	2			0,61 cdefg	0,69 cdef			0,42 abcde	0,43 abcde
T3	3			0,59 cdefg	0,61 cdefg			0,40 bcde	0,45 abcde
T3	4			0,62 cdefg	0,63 cdefg			0,35 cde	0,38 bcde
T3	5			0,74 cde	0,77 bcd			0,36 cde	0,41 bcde
T3	6			1,04 ab	1,07 a			0,42 abcde	0,50 abcde
T3	7							0,47 abcde	0,60 abc
T3	B / 8			0,71 cdef	0,66 cdefg				0,67 a

Les lettres après chaque valeur indiquent le résultat du test HSD de Tukey. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (risque d'erreur < 5%).

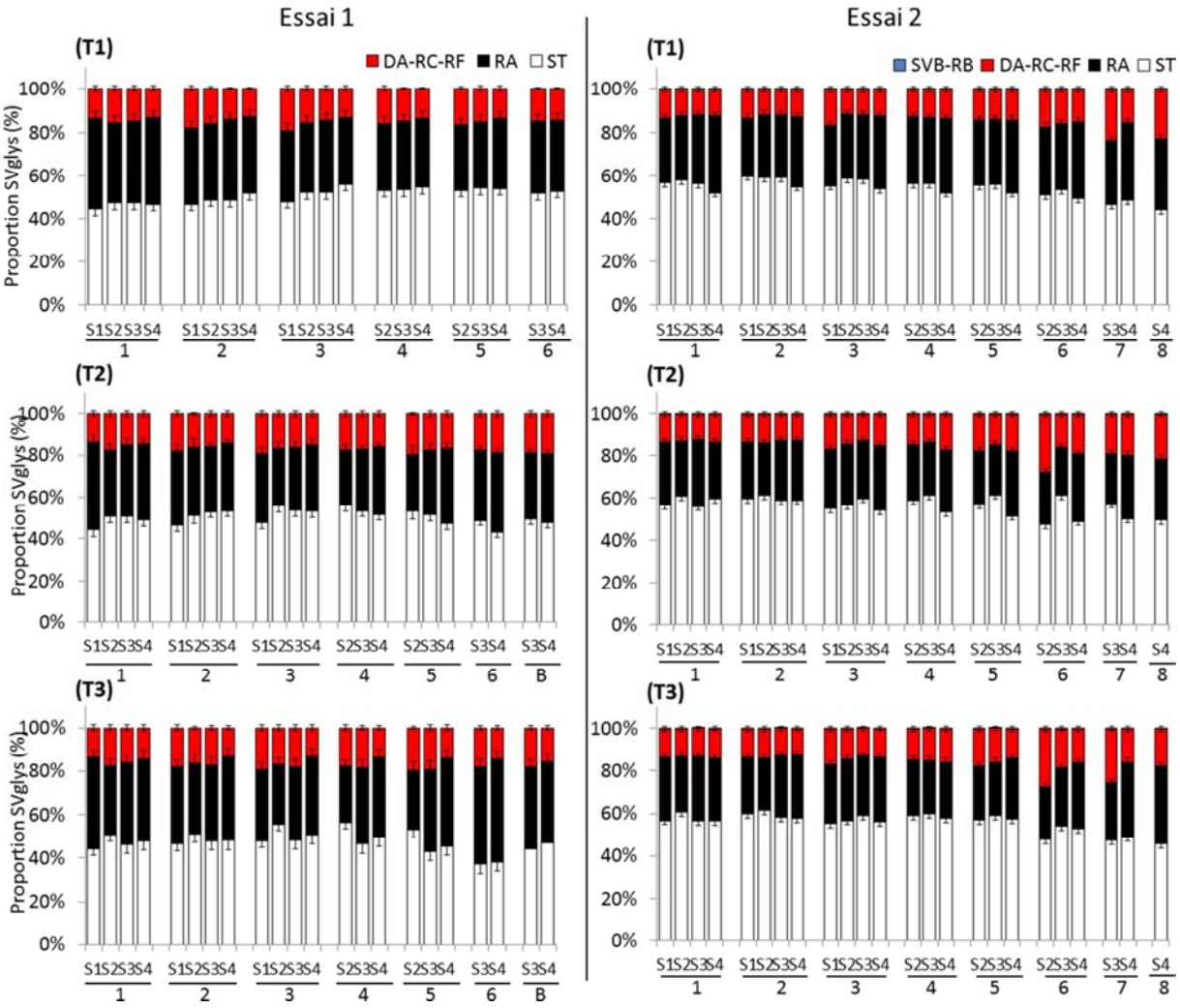


Figure 37: Proportion individuelle des différents SVglys (%; moyenne ± SEM) du génotype A lors des essais 1 et 2, selon le traitement photopériodique (T1, T2 & T3), l'étage foliaire (1 à 6 et bractées pour l'Essai 1 ; 1 à 8 pour l'Essai 2) et la date de prélèvement (S1, S2, S3 et S4).
L'erreur standard de la moyenne (SEM) a été calculée à partir du carré moyen de la résiduelle de l'analyse de variance.

3.2.Elaboration de la biomasse et rendement en glycosides de stéviol

3.2.1. Elaboration de la biomasse

Les mesures d'élaboration de la biomasse ont été réalisées lors de l'Essai 1 seulement. Au prélèvement S3, la longueur des entre-nœuds et la hauteur des plantes des traitements T2 et T3 (stade BF) sont significativement plus élevées que pour les plantes de T1. A cette date de prélèvement, il n'y a pas d'effet significatif du traitement photopériodique sur le nombre de nœuds de la tige principale (Tableau 14). Au prélèvement S4, les plantes des traitements T2 et T3 (stade F) ont des entre-nœuds significativement plus grands que les plantes de T1. Néanmoins, seule la hauteur des plantes de T2 est significativement plus élevée que celle des

plantes de T1. Le nombre de nœuds des plantes du traitement T3 est en effet significativement plus faible que celui des autres plantes.

Il n'y a pas d'effet significatif du traitement sur la surface foliaire moyenne des plantes (Tableau 14). Le LMA est néanmoins significativement plus élevé pour les plantes des traitements T1 et T3 par rapport aux plantes du traitement T2 aux dates de prélèvement S3 et S4. Lors du dernier prélèvement (S4), la biomasse des plantes est la plus élevée sous le traitement T1 et la plus faible sous le traitement T2. Le LMR est stable au fil des prélèvements pour les plantes de T1, restées au stade végétatif. Il diminue de manière significative à chaque prélèvement pour les plantes de T2 et T3, dont le traitement photopériodique a provoqué l'induction florale. Ainsi, aux prélèvements S3 et S4, la biomasse foliaire la plus élevée est obtenue sous T1.

Tableau 14: Valeurs moyennes des paramètres pour l'élaboration de la biomasse du génotype A lors de l'Essai 1, selon le traitement photopériodique (T1, T2 & T3) et la date de prélèvement (S1, S2, S3 et S4).

Taitement	Prélèvement	Hauteur (mm)	Nombre de nœuds	Inter-nœud moyen (mm)	Surface foliaire moyenne (cm^2)	LMA ($mg.cm^{-2}$)	Biomasse plante (g)	LMR (%)	Biomasse foliaire (g)
T1 (LD)	S1 (V)	137 ^{g}	10,0 ^{b}	13,8 ^{d}	13,9 ^{b}	6,3 ^{b}	5,2 ^{e}	66,9 ^{abc}	3,5 ^{f}
	S2 (V)	179 ^{gf}	12,8 ^{ab}	14,9 ^{cd}	14,8 ^{ab}	7,5 ^{a}	9,0 ^{cd}	68,4 ^{a}	6,2 ^{de}
	S3 (V)	243 ^{de}	11,8 ^{ab}	20,6 ^{cd}	16,8 ^{ab}	5,1 ^{cd}	11,6 ^{c}	68,0 ^{ab}	7,9 ^{bc}
	S4 (V)	316 ^{c}	13,8 ^{a}	23,6 ^{bc}	13,3 ^{b}	6,2 ^{b}	18,9 ^{a}	64,3 ^{bc}	12,2 ^{a}
T2 (SD)	S2 (IF)	226 ^{ef}	11,6 ^{ab}	19,8 ^{cd}	16,4 ^{ab}	4,9 ^{d}	7,2 ^{de}	63,4 ^{c}	4,6 ^{ef}
	S3 (BF)	431 ^{b}	12,2 ^{ab}	35,5 ^{a}	16,8 ^{ab}	4,0 ^{e}	10,0 ^{cd}	56,3 ^{de}	5,6 ^{de}
	S4 (F)	500 ^{a}	13,8 ^{a}	36,8 ^{a}	18,6 ^{a}	4,6 ^{de}	11,8 ^{c}	50,3 ^{f}	5,9 ^{de}
T3 (SD/LD)	S3 (BF)	418 ^{b}	13,0 ^{ab}	32,7 ^{a}	17,7 ^{ab}	5,8 ^{bc}	11,3 ^{c}	58,2 ^{d}	6,6 ^{cd}
	S4 (F)	302 ^{cd}	9,8 ^{b}	30,9 ^{ab}	15,1 ^{ab}	7,1 ^{a}	15,4 ^{b}	53,8 ^{ef}	8,3 ^{b}

Les lettres après chaque valeur indiquent le résultat du test HSD de Tukey. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (risque d'erreur < 5%).

3.2.2. Rendement en glycosides de stéviol

La teneur en SVglys et la biomasse foliaire étant plus élevées sous le traitement T1 (plantes au stade végétatif), le rendement en SVglys le plus élevé est obtenu sous ces mêmes conditions (Tableau 14 et Tableau 15). Au prélèvement S4, le rendement en SVglys des plantes de T3 est également significativement plus élevé que celui des plantes de T2.

Une variabilité de la composition en SVglys à l'échelle de la plante est obtenue entre les différents traitements : la proportion de RA est significativement plus élevée pour les plantes de T3 au prélevement S4, conduisant à un ratio RA/ST plus élevé pour ces plantes que pour les plantes des autres traitements. Par ailleurs, la proportion de ST est significativement plus élevée et la proportion des SVglys mineurs plus faible lors du prélèvement S3 pour les plantes de T3 par rapport aux plantes de T1 (Tableau 15).

Tableau 15: Valeurs moyennes de la teneur en SVglys (mg.g^{-1} MS), du rendement en SVglys (g/plante), des proportions individuelles des SVglys (% de la teneur totale) et du ratio RA/ST du génotype A lors de l'Essai 1, selon le traitement photopériodique (T1, T2 & T3) et la date de prélèvement (S1, S2, S3 et S4).

Traitement	Prélèvement	Teneur en SVglys (mg.g^{-1} MS)	Rdt SVglys (g/plante)	Proportion RA (%)	Proportion ST (%)	Proportion DA+RC+RF (%)	Ratio RA/ST
T1 (LD)	S1 (V)	99 ^{cd}	0,35 ^{d}	36,1 ^{ab}	46,0 ^{c}	17,9 ^{abc}	0,79 ^{a}
	S2 (V)	131 ^{ab}	0,81 ^{bc}	31,7 ^{cd}	51,1 ^{ab}	17,2 ^{abcd}	0,62 ^{d}
	S3 (V)	125 ^{bc}	0,98 ^{b}	33,0 ^{bc}	51,8 ^{a}	15,2 ^{de}	0,64 ^{bcd}
	S4 (V)	157 ^{a}	1,91 ^{a}	32,7 ^{bcd}	52,7 ^{a}	14,6 ^{e}	0,62 ^{cd}
T2 (SD)	S2 (IF)	90 ^{d}	0,41 ^{d}	29,0 ^{d}	51,7 ^{a}	19,3 ^{a}	0,56 ^{d}
	S3 (BF)	102 ^{cd}	0,57 ^{cd}	32,5 ^{bcd}	51,2 ^{ab}	16,4 ^{bcde}	0,64 ^{cd}
	S4 (F)	88 ^{d}	0,52 ^{d}	32,4 ^{bcd}	51,8 ^{a}	15,7 ^{cde}	0,63 ^{cd}
T3 (SD/LD)	S3 (BF)	89 ^{d}	0,58 ^{cd}	35,1 ^{abc}	46,6 ^{bc}	18,2 ^{ab}	0,76 ^{abc}
	S4 (F)	105 ^{bcd}	0,88 ^{b}	37,0 ^{a}	48,2 ^{abc}	14,8 ^{e}	0,77 ^{ab}

Les lettres après chaque valeur indiquent le résultat du test HSD de Tukey. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (risque d'erreur < 5%). ST, stévioside ; DA, dulcoside A ; RA, RC et RF, rébaudiosides A, C et F

4. DISCUSSION

Les résultats de cette étude montrent un effet plus marqué de la longueur de jour que du stade de développement sur la teneur en SVglys dans les feuilles *S. rebaudiana*. En accord avec les résultats obtenus par Métivier et Viana (1979), la teneur en SVglys est plus élevée pour les feuilles développées sous jours longs que pour les feuilles développées sous jours courts, quel que soit le stade de développement des plantes, arguant en faveur de l'hypothèse selon laquelle plus d'énergie est déployée vers la voie de biosynthèse des SVglys lorsque l'énergie lumineuse perçue par la feuille est plus élevée : les feuilles en conditions de jours longs ont reçu deux fois plus d'énergie lumineuse pour leur activité photosynthétique que celles en conditions de jours courts. Métivier et Viana (1979) ont proposé, pour expliquer ce phénomène, une accumulation des SVglys favorisée par un déséquilibre de la balance carbone-azote dans les feuilles. Les terpènes ne contiennent pas, en effet, d'azote. Leur production pourrait alors être favorisée dans des environnements où le carbone issu de la photosynthèse n'est pas limitant alors que l'assimilation azotée peut l'être (Bryant *et al.*, 1983; Coley *et al.*, 1985). Dans notre étude, comme dans celle Métivier et Viana (1979), les plantes ont reçu la même fertilisation sous toutes les conditions. Sous jours longs, la masse sèche par unité de surface foliaire (LMA) a été plus élevée, reflétant une activité photosynthétique des plantes plus élevée. La balance carbone-azote n'était donc pas la même pour les feuilles développées sous jours longs et sous jours courts. Récemment, il a été montré chez *A. thaliana* que la 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (HDR), une enzyme clé dans la voie du 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP), ne dépend pas seulement du flux de carbone issu de la photosynthèse, mais aussi d'un système de détection du NO_3^- (Ward *et al.*, 2011). Ainsi une régulation complexe de la voie du MEP et de ses produits, selon le statut azoté et carboné de la feuille, pourrait avoir lieu chez *S. rebaudiana*.

Le stade de développement n'a pas été déterminant pour l'accumulation en SVglys : le retour des plantes en jours longs après avoir été initiées en phase reproductive (T3) a entraîné une augmentation de la teneur en SVglys dans les feuilles les plus jeunes. A l'échelle de la plante, la diminution de la teneur en SVglys observée aux stades bouton floral et floraison (T2 et T3) est due à une accumulation en SVglys plus faible dans les feuilles développées sous jours courts. Contrairement aux résultats obtenus dans le chapitre 5, il n'y a pas eu d'augmentation de la proportion du SVB et du RB (SVglys comportant un glucose de moins

que le ST et le RA respectivement) à la floraison. Deux hypothèses avaient été discutées, pouvant expliquer cette augmentation : la dégradation du ST et du RA par l'action de *β*-glycosidases endogènes ou par l'action de *β*-glycosidases exogènes d'origine bactérienne ou fongique. Dans la présente étude, l'ensemble des prélèvements a été réalisé sur des plantes saines. Ainsi, la dégradation du ST et du RA observée dans le cadre du chapitre 5 pourrait être due à l'action de *β*-glycosidases exogènes. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour approfondir cette dernière hypothèse.

Cette étude a également permis d'observer les mécanismes d'accumulation des SVglys à l'échelle de la feuille. Lors de l'essai 2, des feuilles ont été prélevées dès leur initiation, puis, aux prélèvements suivants, alors qu'elles étaient développées. Pour ces feuilles, la teneur en SVglys a augmenté entre le 1er et le 2ème prélèvement (1 semaine), puis est restée stable lors des prélèvements ultérieurs. Cette augmentation a été variable selon les conditions photopériodiques de développement de la feuille : de nulle à faible sous jours courts, élevée sous jours longs. Ces résultats suggèrent une accumulation en SVglys dans les feuilles lors de leur développement, pendant une semaine environ, jusqu'à ce qu'elles atteignent leur potentiel maximum, variable selon l'activité photosynthétique de la feuille. Une fois ce maximum atteint, il n'y a plus d'évolution de la teneur en SVglys. Deux hypothèses peuvent alors être formulées : (i) soit la voie de biosynthèse des SVglys est toujours active : il y aurait alors un turnover continu (dégradation/synthèse) des SVglys. Une expérience de marquage au $^{14}CO_2$ a néanmoins montré un faible turnover des SVglys dans des feuilles en développement et dans des feuilles pleinement développées (De Guzman, 2010) ; (ii) soit la voie de biosynthèse des SVglys n'est plus active, et les SVglys produits restent stockés dans la vacuole. Selon cette dernière hypothèse, la voie de biosynthèse des SVglys ne serait donc active que pendant une courte période, lors du développement de la feuille.

Alors que la teneur en SVglys a été variable selon les conditions de croissance des plantes, la proportion individuelle des différents SVglys est restée relativement stable. Comme discuté dans les chapitres 4 et 5, le faible effet des conditions de croissance des plantes sur la composition en SVglys suggère que l'activité des UGTs est moins régulée par des signaux environnementaux que celle des enzymes intervenant avant la formation du stéviol. Néanmoins, d'autres études ont montré un effet du stade de développement et de la photopériode sur le ratio RA/ST (Mohamed *et al.*, 2011 ; Ceunen et Geuns, 2013c ; Tavarini et Angelini, 2013).

Le stade de développement des plantes a eu un effet sur l'élaboration de leur biomasse. Alors que le stade végétatif a favorisé l'accumulation de biomasse foliaire, le LMR a diminué au fil des prélèvements pour les plantes en phase reproductive (élongation des entre-nœuds, augmentation de la masse des ramifications par rapport à la masse des feuilles). Par ailleurs, des conditions de jours longs ont favorisé l'assimilation carbonée des feuilles. La combinaison des valeurs de biomasse et de teneur en SVglys ont conduit à un rendement plus élevé pour les plantes conduites sous jours longs et restées au stade végétatif (T1). Ainsi, la croissance des plantes sous des conditions de jours longs (été en zone tempérée) favoriserait l'élaboration de la biomasse foliaire et l'accumulation en SVglys. La date d'implantation et le port de la plante apparaissent alors comme des paramètres essentiels à prendre en compte pour l'élaboration du rendement : une implantation dès le mois de Mai d'une plante au port ramifié à la base, produisant de nombreuses feuilles dès son démarrage, permettrait la production de nombreuses feuilles sous des conditions de jours longs.

En conclusion, cette étude a montré un effet positif des conditions de jours longs sur l'élaboration de la biomasse foliaire et sur l'accumulation en SVglys. La composition en SVglys est apparue moins influencée par les conditions de croissance des plantes. La biomasse foliaire et la teneur en SVglys étant des facteurs déterminants pour l'élaboration du rendement de *S. rebaudiana*, ce dernier pourrait être favorisé par une implantation précoce des plantes en champ, qui permettrait, en milieu tempéré, le développement des feuilles sous des jours longs.

Chapitre 7. Effet de la fertilisation sur l'élaboration de la biomasse, la teneur et la composition en glycosides de stéviol

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'une publication scientifique.

Nitrogen limitation alters biomass production but enhances steviol glycoside concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni

Claire Barbet-Massin, Simon Giuliano, Lionel Alletto, Jean Daydé et Monique Berger

Plos One (accepté)

1. INTRODUCTION

In the last decade, natural substitute sweeteners for sugar and synthetic sweeteners have received increasing interest owing to their low-calorie properties and to their potential dietary health benefits. Among the various sources of natural sweeteners, *Stevia rebaudiana* Bertoni, a perennial shrub of the *Asteraceae* family native to limitrophe region between Paraguay and Brazil, is characterized by high concentration of steviol glycosides (SVglys) in its leaves, which are up to 200 to 400 times sweeter than sucrose. Commercial exploitation of *S. rebaudiana* started in the 1970s in Japan (Rajasekaran *et al.*, 2007) and then extended to China, Asia, South America, and the USA (Brandle and Rosa, 1992; Kienle, 2010; Yadav *et al.*, 2011). SVglys have been authorized as a food additive in the European Union Since November 2011. Experimental cultivations in Europe have shown the ability of the specie to be cultivated in temperate climates (Andolfi *et al.*, 2006; Tavarini and Angelini, 2013). *S. rebaudiana* appears as a promising alternative culture in Europe, but additional investigations must be made to assess its cultivation plant requirements.

The SVgly content in *S. rebaudiana* leaves varies according to genotype, phenological stage, and growth conditions (Brandle and Rosa, 1992; Brandle *et al.*, 1998), at concentrations ranging from 10% to 30% of their dry mass (Richman *et al.*, 1999). It is generally accepted that SVgly content increases gradually up to the budding phase and the onset of flowering (Bondarev *et al.*, 2003; Ceunen and Geuns, 2013c). Little research is currently available on how resource availability (mineral nutrition, light intensity) affects SVgly production in plants (Patil, 2010; Aladakatti *et al.*, 2012; Kumar R. *et al.*, 2012; Pal *et al.*, 2013). It was shown that the application of foliar nutrients [mainly KNO_3 and $Ca(NO_3)_2$] led to an increase in chlorophyll, nitrogen, and potassium content in leaves but not in SVgly content (Pal *et al.*,

2013). In addition, an increase of light intensity promotes the leaf biomass production but has no significant effect on SVgly content (Kumar R. *et al.*, 2012). However, for *S. rebaudiana*, the separate and combined effects of light intensity and mineral nutrition on plant physiology, growth, and SVgly production remain poorly understood. Yet progress in productivity is needed not only in terms of increasing the SVgly content, but also in terms of increasing the total leaf biomass and leaf to stem ratio.

SVglys are glycosylated diterpenoids whose biosynthesis pathway is partly shared by gibberellins (GA) (Brandle and Telmer, 2007). The accumulation of SVglys occurs in active photosynthetic tissues (mainly leaves). Steviol (SV), the diterpene aglycone moiety of SVglys, is synthetized via the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway, which occurs in the chloroplasts and whose precursors are pyruvate and glyceraldehyde 3-phosphate (Totté *et al.*, 2000). The resulting isopentyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate are converted to geranylgeranyl diphosphate (GGDP). The first steps in producing kaurenoic acid from GGDP occur through the action of copalyl diphosphate synthase (CPS), kaurene synthase (KS), and kaurene oxidase (KO) (Brandle and Telmer, 2007) (Figure 38). Then the pathways leading to GA and SVglys diverge. Steviol is produced by hydroxylation of the kaurenoic acid at the C-13 position by the kaurenoic acid 13-hydroxylase (KAH) (Kim *et al.*, 1996) (Figure 38). SV is then glucosylated, rhamnosylated, or xylosylated through the action of UDP-dependent glycosyltransferases (UGTs), to form the various SVglys (Richman *et al.*, 2005) (Figure 38). The two major SVglys, stevioside (ST) and rebaudioside A (RA), account for more than 90% of the total glycoside content found in *S. rebaudiana* leaves (Brandle, 1999). ST is estimated to be 110-270 times sweeter than sucrose but has an astringent aftertaste. RA is reported as being 140-400 times sweeter than sugar and presents more pleasant sensory characteristics (Andolfi *et al.*, 2006; Tavarini and Angelini, 2013).

The MEP pathway also supports the synthesis of photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) and hormones (gibberellins and abscisic acid) (Cordoba *et al.*, 2011). The two precursor molecules for the MEP pathway (G3P and pyruvate) are derived directly from photosynthesis or glycolysis. Not surprisingly, the MEP pathway is regulated not only by environmental signals but also by sugar levels (Cordoba *et al.*, 2009). Balancing the metabolism of C and N is crucial for plants (Tschoep *et al.*, 2009). Recently, it was shown in *Arabidopsis* that 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate (HDR), a key enzyme in the MEP pathway, depends not only on the photosynthetic carbon flux but also on NO_3^--sensing systems (Ward *et al.*, 2011). Thus, a complex regulation of the MEP pathway must integrate

both photosynthesis and NO_3^- availability (Ward *et al.*, 2011).

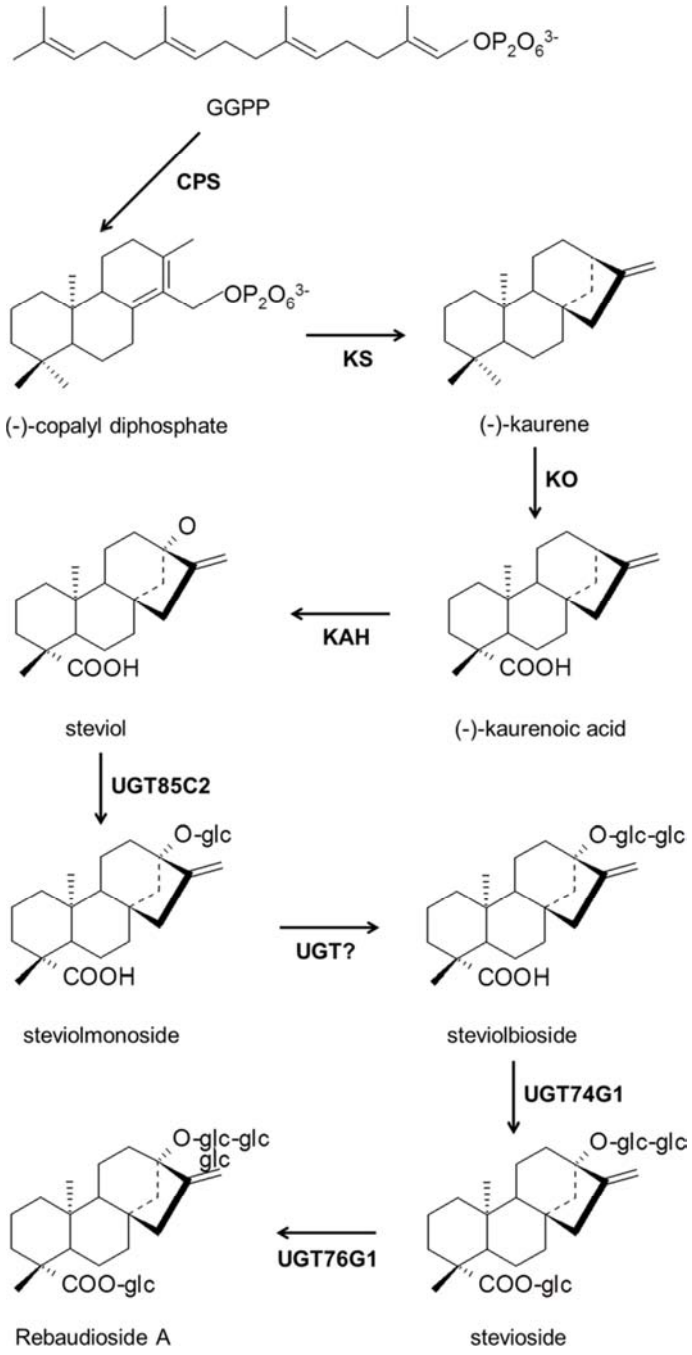


Figure 38: Biosynthetic pathway of steviol and its glycosides leading to rebaudioside A.
GGPP, geranylgeranyl diphosphate; CPS, copalyl diphosphate synthase; KS, kaurene synthase; KO, kaurene oxidase; KAH, kaurenoic acid hydroxylase; UGTs, UDP-glycosyltransferases.

High concentrations of carbon-based secondary compounds (CBSCs) due to N deficiency have been observed in plants for a long time (Bryant *et al.*, 1983; Coley *et al.*, 1985). To explain this phenomenon, the carbon-nutrient-balance (CNB) hypothesis (Bryant *et*

al., 1983; Tuomi *et al.*, 1984; Herms and Mattson, 1992) postulates a tradeoff between primary and secondary metabolisms. According to this hypothesis, plants preferentially allocate carbohydrates to growth so that more carbon is available for CBSC production only when, because of a lack of nutrients, plant growth is more restricted than photosynthesis (Herms and Mattson, 1992). Environmental conditions that would result in a high C/N ratio, and therefore to higher concentration of CBSCs, include high light levels, high inorganic carbon availability, and low nutrient availability (Cronin and Hay, 1996). This hypothesis is supported by results obtained on phenolic compounds (Hale *et al.*, 2005; Ibrahim *et al.*, 2011; Izquierdo *et al.*, 2011; Massad *et al.*, 2012) but is less consistent with observed accumulations of terpenoids in plants (Haukioja *et al.*, 1998; Koricheva *et al.*, 1998; Massad *et al.*, 2012). However, a high concentration of centellosides, which are terpenoids that accumulate in the leaves of *Centella asiatica,* was recently observed in plants subjected to N limitation (Müller *et al.*, 2013).

In this study we hypothesized that changes in the balance between carbon and nitrogen can have opposite effects on biomass production and SVglys accumulation. Thus the relationships between CO_2 assimilation, leaf N content, biomass production and SVgly content were studied in two experiments with different levels of N fertilization i) in a growth chamber where light limits maximum CO_2 assimilation, ii) in a greenhouse with natural light. Two genotypes of *S. rebaudiana*, were chosen for their different SVgly profiles. Leaf N content, SVglys accumulation and biomass production were also measured on those genotypes in a four-location field experiment to test the effectiveness of these relationships in more realistic conditions of production.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Two genotypes of *S. rebaudiana* were chosen from a population of "Criola" (a native population originating from Paraguay). These two genotypes have been studied since 2010 at the Agricultural and Food Sciences Department (INP-EI Purpan) at the University of Toulouse, France. Their SVgly composition is highly stable: genotype A contains ST and RA, genotype B contains ST but not RA. Both genotypes contain other less concentrated SVglys. The plants used in the experiments reported herein were obtained from stem cuttings taken from two-year-old parental plants.

2.2. Experiments and growth conditions

2.2.1. Controlled and semicontrolled conditions

The same experimental procedures were applied to both experiments under controlled conditions (CC, growth chamber) and semicontrolled conditions (SCC, greenhouse). The experiments were conducted at the INP-EI Purpan, France (43°36'N, 1°24'E). Four weeks before the experiments, the plants (24 per genotype) were transplanted into three-liter pots containing loam (12:14:24 NPK kg m^{-3}). At the beginning of the experiments, the plants were pruned, leaving 5 cm stems. From January to March 2013, the experiment was conducted under CC, in a growth chamber with 200 W of lighting supplied by high-pressure sodium (HPS) lamps, 200 W of lighting supplied by metal-halide (MH) lamps, and 400 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ of photosynthetically active radiation (PAR) supplied at the plant level. The photoperiod was 16 h with 23 °C/18 °C day/night temperatures. The relative humidity (RH) was comprised between 70 and 80 %. From May to July of 2013, the experiment was replicated under SCC, in greenhouse, with PAR of 1000 to 2000 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$. Day length was comprised between 14 and 15 h. The air temperature was comprised between 10 and 32 °C during the day and 10 and 24 °C at night. The RH fluctuated between 50 and 80 %. At the end of both experiments (10^{th} week), the plants had reached the flower-budding stage.

Both genotypes (A and B) were treated with three levels of N (N1, N2, and N3, which corresponds to low, medium, and high levels of N, respectively; see Table 16 for composition and quantity). The plants were also supplied with P and K and a micro-element solution containing 0.01% B, 0.003% Mo, 0.001% Co, 0.01% Fe, 0.025% Mn, 0.01% Zn, and 0.01% Cu (B'Essentials, General Hydroponics Europe, France) enriched with Mg. Plants were daily irrigated (75 – 150 mL pot^{-1}, depending on plant size and temperature) to avoid water stress. The fertilizers were given weekly. The experiments were arranged in randomized complete block design with two blocks and four replications by block.

Table 16 : Composition of fertilizing solution and quantities supplied for experiments under controlled conditions (CC and SCC).

Mineral element	Concentration ($g\ L^{-1}$)	Solution composition	*Volume supplied by week per plant (mL)*		
			N1	N2	N3
N	60	NO_3^-;NH_4^+, $CO(NH_2)_2$	0.18	1.575	3.15
Equivalent N (kg ha^{-1}, density of 65 000 pl ha^{-1})			7	60	120

2.2.2. Field conditions

The experiment was carried out during one growing season (2014), in four experimental sites all located in south-west France: sites I and II (43°54'N, 1°41'E) in the region of Tarn, sites III (43°36'N, 1°24'E) and IV (43°29'N, 1°14'E) in the region of Haute-Garonne. The four locations were private lands, the experiments were authorized by the owners. No specific permissions were required for these activities. These field studies did not involve endangered or protected species. The characteristics of the four experimental fields are detailed in Table 17. In each site the experiment was laid out in a randomly block design with three blocks. Each plot consisted of 60 plants from the same genotype. Plant density was 6.5 pl m^{-2}, with inter-row and intra-row spacing of 0.5 x 0.3 m on site I; 10 pl m^{-2} (0.5 x 0.2 m) on site II; 6.5 pl m^{-2} (0.5 x 0.3 m) on site III and 8 pl m^{-2} (0.4 x 0.3 m) on site IV. Plants were transplanted in the fields in May 27th-30th 2014 and harvested at flower budding stage, in mid-September.

Table 17 : Characteristic of the four location sites for experiments under field conditions.

Climatic characteristics from transplanting to harvest	Field I	Field II	Field III	Field IV
T mean (°C)	20.8	20.8	20.3	20.4
T max (°C)	27.5	27.5	26.1	25.5
T min (°C)	14.1	14.1	15.0	13.0
Cumulative degree-day (°C) [a]	1705	1705	1674	1653
Rainfall (mm)	204	204	231	199
Field characteristics				
Slope and orientation	5% N	0%	0%	0%
Sand (2-0.05 mm %)	38.9	25.0	35.7	32.6
Silt (0.05-0.002 mm %)	25.8	60.0	47.4	49.2
Clay (< 0.002 mm %)	35.3	15.0	14.5	16.1
pH(H_2O)	8.3	6.50	6.9	6.25
Organic matter (%)	1.69	2.50	2.60	2.05
Preceding crop	Fallow	Stevia	Fallow	Maize
Irrigation (mm)	20	10	160	120
Fertilization	None	None	None	None

[a] $\text{Cumulative degree} - \text{day} = \sum_{\text{day}=1}^{n} \frac{\text{Tmax}+\text{Tmin}}{2} - \text{Vegetation zero}$; with vegetation zero fixed at 6°C.

2.3. Sampling and harvest analysis

The aerial biomass of each plant was harvested. Leaves and stems were separated by hand and oven dried at 40 °C for at least 48 h. Three yield component indicators were measured: the total dry-plant biomass, the leaf biomass (g DM/pl, where "DM" means "dry matter"), and the leaf-mass ratio (LMR, %), which is the fraction of the total-plant biomass (leaves + stems) due to leaves. For experiments under controlled (CC) and semicontrolled conditions (SCC), the leaf area (cm^2), leaf biomass (g), and specific leaf weight (SLW, g m^{-2}) were collected from the fully expanded leaves used for gas-exchange measurements.

2.4. Nitrogen content in leaves

For each sample, 100 mg of dried and finely ground leaves were placed in a tin capsule. Their N concentration (% per dry mass) was determined by using a Thermo Scientific FLASH 4000 Nitrogen/Protein analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). N concentration was used to compute the specific leaf N content (SLN, g m^{-2}) for plants grown under CC and SCC.

2.5. Steviol glycoside content and composition in leaves

100 mg of dried and finely ground leaves were extracted with 10 mL water at 50 °C for 30 min. After centrifugation (7000 rpm, 5 min) and filtration (0.2 µm), 20 µL of the resulting solution were injected into a high-performance liquid-chromatography system on a C18 column (250 x 4.6 mm inner diameter, 5 µm particle size; Luna C18 Phenomenex, USA). SVglys were eluted by using an isocratic phase of ACN 31%: H_2O (pH = 2.6, HCOOH) 69% at 1 mL min^{-1} flow rate for 30 min. The SVglys (including ST, RA, and five minor SVglys) were detected at 200 nm. For quantification, stevioside was used as an external standard. Results were expressed as percentage per unit dry mass for the SVgly total content and as percentage of SVgly total content for the SVgly (ST, RA and minor SVglys) proportions.

2.6. Leaf gas-exchange measurements

These measurements were made under CC and SCC only. The parameters measured were the maximum net rate of CO_2 assimilation, A_{max} (*i.e.*, the light-saturated CO_2-assimilation rate at ambient CO_2 concentration), the light-saturation point I_k (*i.e.*, the light intensity at which A_{max} is reached), the dark respiration rate R_d (*i.e.*, the respiratory carbon loss), and the apparent quantum yield of photosynthesis Φ_{l0} (*i.e.*, the efficiency with which absorbed photons are converted into fixed carbon) (Lambers *et al.*, 2008). In both experiments, light saturation curves for photosynthesis (*A vs. Q*) were acquired at the flower-budding stage from fully expanded leaves by using a portable LI-6400XT system (Li-Cor, Lincoln, NE, USA). The ambient CO_2 concentration C_A of the cuvette in the open gas-exchange chamber was precisely regulated at 400 µmol CO_2 mol^{-1} by using a CO_2 injection mixer. The leaves were maintained at the ambient temperature (23 °C for CC, 20–25 °C for SCC) in the open gas-exchange chamber, with a relative humidity between 50% and 70%. Measurements were made at decreasing photosynthetic photon flux densities (PPFDs) of 2000, 1500, 1000, 500, 250, 120, 60, 30, 15, and 0 µmol m^{-2} s^{-1}. When needed, the measurements were started at an intermediate PPFD (500 or 1000 µmol m^{-2} s^{-1}), which was then increased to 2000 µmol m^{-2} s^{-1} to acclimatize the leaves to high light intensities. The EXCEL routines developed by Lobo *et al.* (2013) were used to fit the resulting light response curves to a rectangular hyperbola from the following Michaelis–Menten-based model (Baly, 1935):

$$P_N = [(\Phi_{I0} \text{ x } I \text{ x } A_{max})/(\Phi_{I0} \text{ x } I + A_{max})]\text{-}R_d \quad (1)$$

where P_N is the net photosynthesis rate in $\mu mol_{(CO2)}\, m^{-2}\, s^{-1}$, $\Phi_{(I0)}$ is the apparent quantum yield at $I = 0$ in $\mu mol_{(CO2)}/\mu mol_{(photons)}$, I is the photosynthetic photon flux density in $\mu mol_{(photons)}\, m^{-2}\, s^{-1}$, A_{max} is the maximum gross photosynthesis rate in $\mu mol_{(CO2)}\, m^{-2}\, s^{-1}$, and R_d is the dark respiration rate in $\mu mol_{(CO2)}\, m^{-2}\, s^{-1}$.

2.7. Statistical analysis

The R software (R.2.15.1) (R Core Team, 2013) was used to perform the statistical analyses. A two-way complete analysis of variance was used for both experiments under CC and SCC, to determine if the N supply (N), genotype (G), and their interactions affected biomass and leaf production, SVgly content, and associated physiological parameters. For the experiment under field conditions (FC), a two-way complete analysis of variance was performed to determine if the location sites (LS), genotype (G), and their interactions affected biomass and SVgly accumulation. Significant differences between the treatments were determined by using Fisher's least significant difference (LSD) test from the R package AGRICOLAE. The coefficient of determination R^2 was used to establish the relationship between plant biomass, SVgly accumulation and nitrogen content in leaves.

3. RESULTS

3.1. Nitrogen content in leaves

Under both CC and SCC, N content in leaves (%) and SLN (g m^{-2}) were significantly lower under N1 supply than under N2 and N3 supplies (Figure 39). For each N supply, N content in leaves reached the same mean values in both experiments. However, for both genotypes, SLN was lower under CC compared to SCC under high N-supply levels (N2 and N3). Indeed, SLN takes into account the leaf size and thickness: the specific leaf weight (SLW, g m^{-2}) was higher for plants grown under SCC at high N-supply levels (N2 and N3) compared to those grown under CC (data not shown). Under FC, the location site (LS) and the G x LS interaction influenced N content in leaves, which was significantly lower for the plants grown in field I than in the field II, III and IV (Figure 39).

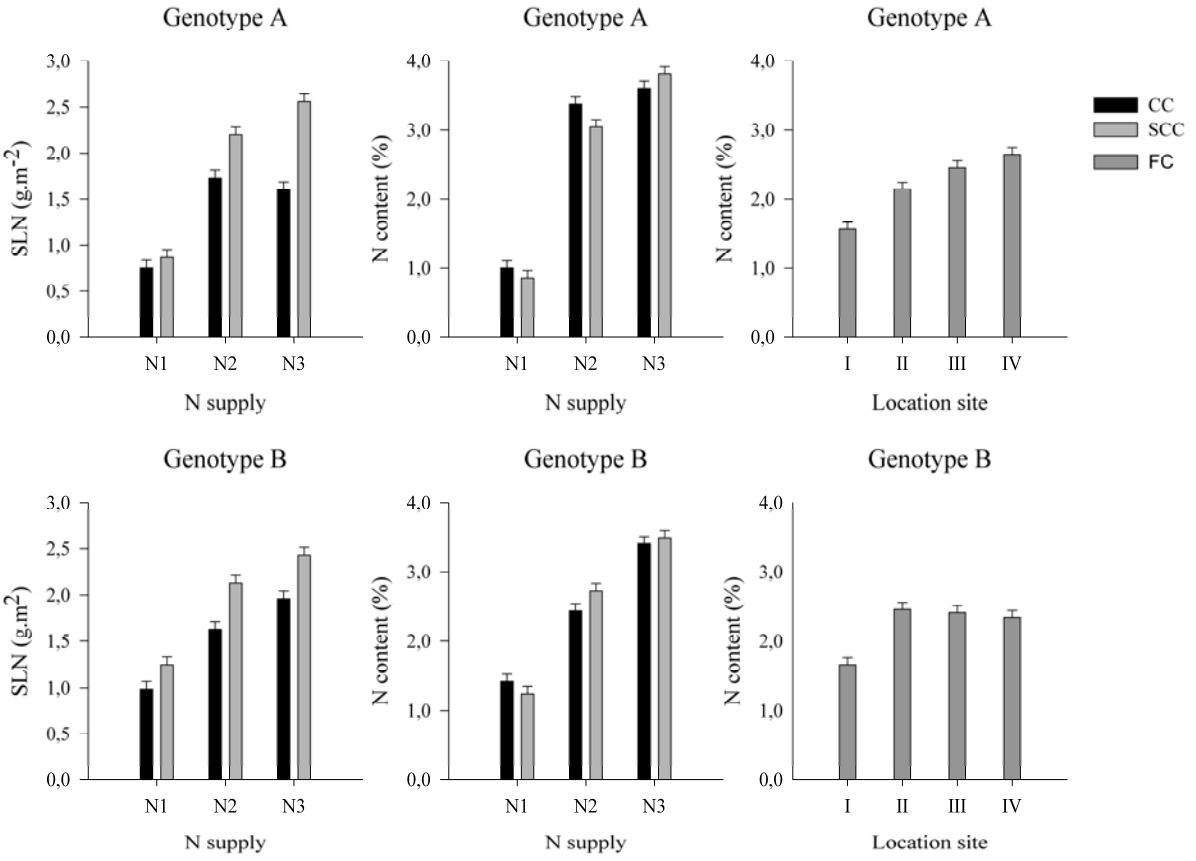


Figure 39 :Specific leaf nitrogen (SLN, g.m^{-2}; mean±SE) and nitrogen content in leaves (N content, %; mean±SE) for genotypes A and B in controlled (CC), semi-controlled (SCC) and field conditions (FC) at different levels of fertilization (N1, N2, N3) or in different location sites (I, II, III, IV).

3.2. Yield components

3.2.1. Biomass production

For both genotypes, no significant differences were obtained at the three different levels of N supply for plant and leaf biomass (g DM) under CC. In contrast, under SCC, leaf biomass increased with N supply for both genotypes (Table 18). Under FC, for both genotypes, the biomass production per plant was significantly higher on site III, and significantly lower on site I (Table 18). Even if other environmental conditions may have influenced biomass accumulation, the relationship between N content in leaves and plant biomass (Figure 40) shows it generally increased with N content in leaves (with exception of genotype A under CC).

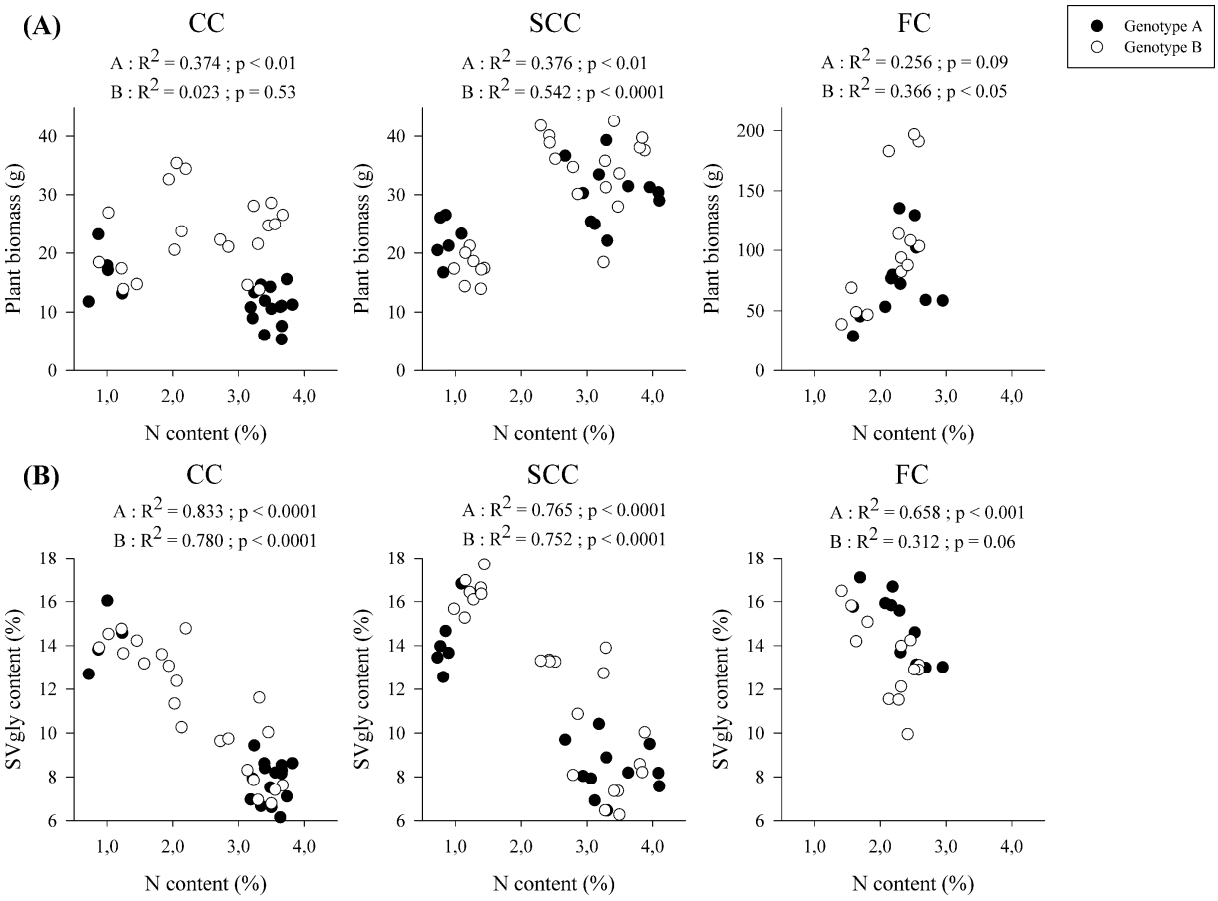


Figure 40: (A) Relationship between nitrogen content in leaves (N content, %) and plant biomass (g DM) and (B) Relationship between N content (%) and steviol glycoside content in leaves (SVgly content, %) for genotypes A and B in controlled (CC), semi-controlled (SCC) and field conditions (FC).

Table 18 : Yield components (mean ± SEM with SEM calculated from the ANOVA residual mean square with 28 df under CC, 32 df under SCC and 16 df under FC) as affected by genotype (G) = A and B and nitrogen supply (N) = N1, N2, and N3 or location site (LS) = I, II, III, IV.

Growth conditions (GC)	Genotype (G)	Nitrogen supply/ Location site (LS)	Plant biomass (g DM)	Leaf biomass (g DM)	LMR (%)	SVgly content (% DM)	SVgly yield (g)	*N*
CC	A	N1	16.6 ± 2.3	11.6 ± 1.4	70.3 ± 2.0	12.8±0.6	1.6±0.2	5
		N2	12.3 ± 2.0	9.0 ± 1.2	74.2 ± 1.7	7.4±0.5	0.7±0.2	7
		N3	9.5 ± 2.0	7.0 ± 1.2	73.4 ± 1.7	8.0±0.5	0.6±0.2	7
	B	N1	21.0 ± 2.1	12.7 ± 1.3	60.3 ± 1.8	14.1±0.6	1.8±0.2	6
		N2	23.8 ± 1.8	14.5 ± 1.1	61.3 ± 1.6	11.2±0.5	1.6±0.2	8
		N3	24.1 ± 2.0	14.5 ± 1.2	60.4 ± 1.7	7.9±0.5	1.1±0.2	7
SCC	A	N1	21.3 ± 2.0	14.2 ± 1.2	66.6 ± 1.7	13.6±0.5	2.0±0.2	7
		N2	28.3 ± 1.8	18.1 ± 1.1	64.1 ± 1.6	8.1±0.5	1.5±0.2	8
		N3	32.3 ± 2.3	20.9 ± 1.4	64.8 ± 2.0	8.5±0.6	1.8±0.2	5
	B	N1	17.5 ± 1.8	11.3 ± 1.1	64.4 ± 1.6	16.4±0.5	1.9±0.2	8
		N2	32.9 ± 1.8	20.3 ± 1.1	62.5 ± 1.6	12.5±0.5	2.6±0.2	8
		N3	36.3 ± 1.8	21.0 ± 1.1	57.8 ± 1.6	7.8±0.5	1.7±0.2	8
FC	A	I	37.6 ± 7.1	21.3 ± 2.4	59.9 ± 1.7	16.5±0.5	3.5±0.5	3
		II	69.9 ± 7.1	31.6 ± 2.4	45.7 ± 1.7	16.2±0.5	5.1±0.5	3
		III	122.3 ± 7.1	55.7 ± 2.4	45.7 ± 1.7	14.5±0.5	8.1±0.5	3
		IV	63.2 ± 7.1	37.3 ± 2.4	59.4 ± 1.7	13.2±0.5	5.0±0.5	3
	B	I	54.8 ± 7.1	27.1 ± 2.4	49.9 ± 1.7	15.0±0.5	4.1±0.5	3
		II	97.9 ± 7.1	41.8 ± 2.4	43.0 ± 1.7	13.8±0.5	5.8±0.5	3
		III	190.4 ± 7.1	67.8 ± 2.4	35.7 ± 1.7	12.5±0.5	8.4±0.5	3
		IV	98.4 ± 7.1	42.5 ± 2.4	43.3 ± 1.7	11.2±0.5	4.8±0.5	3

N represents the number of plants under CC and SCC, and the number of plots under FC. CC, controlled conditions; SCC, semicontrolled conditions; FC, Field conditions.

The effect of genotype on the LMR ($p < 0.01$) was significant under the three growth conditions. LMR was higher for genotype A (73% under CC, 65% under SCC and 53% under FC) than for genotype B (60% under CC, 62% under SCC, 43% under FC). Under CC the LMR was not affected by N supply, while under SCC the mean LMR value of genotype B was significantly lower under N3 supply than under N1 supply (Table 18). Similarly, for both genotypes under FC, the lower LMR value was achieved on site III, where the plant biomass was the highest (Table 18).

3.2.2. Steviol glycosides content

For both genotypes, SVgly concentration in the leaf decreased with increasing N concentration. SVgly content decreased up to 42% for genotype A and 44% for genotype B with N2 and N3 compared to N1-N supply level under CC. It decreased up to 40% for genotype A and 52% for genotype B under SCC. Under FC plants grown on site IV (2.55% mean N content in leaves) were 20% (genotype A) and 26% (genotype B) lower in SVgly content than those grown on site I (1.62% mean N content in leaves) (Table 18). The relationship between N content and SVgly content in leaves was significant under the three growth conditions for genotype A and under CC and SCC for genotype B (Figure 40).

3.2.3. Steviol glycoside production per plant

The increase in leaf biomass upon increasing N-supply level almost entirely balanced the decrease in SVgly content under CC and SCC, resulting in a nonspecific response of SVgly production (g pl^{-1}; Table 18). However, under FC, the increased plant and leaf biomass on site III resulted in a significantly higher SVgly production for both genotypes on this site (Table 18).

3.3. Plant physiology and photosynthetic capacity

3.3.1. Light response curves

For both genotypes under CC, A_{max} and R_d had essentially the same values regardless of N-supply levels, while Φ_{I0} significantly decreased with enhanced nitrogen supply (Table 19). Under SCC, A_{max} for genotype A increased by 46% and 36% with N3 and N2 N-supply levels, respectively, compared with the N1 N-supply level. This effect was not observed for genotype B. For both genotypes, a high supply of N (N3) resulted in a significant increase in R_d. No statistically significant differences occurred in Φ_{I0} due to the N different treatments (Table 19). For both genotypes, I_k was higher under SCC than under CC (Table 19). This increase was generally accompanied by an increase of A_{max} and R_d.

Table 19 : Parameters values for light-response curves (mean ± SEM with SEM calculated from the ANOVA residual mean square with 33 df under CC and 32 df under SCC) as affected by genotype (G) = A and B and nitrogen supply (N) = N1, N2, and N3.

Growth conditions (GC)	Genotype (G)	Nitrogen supply (N)	A_{max} $\mu mol_{(CO2)}\ m^{-2}\ s^{-1}$	I_k $\mu mol_{(photons)}\ m^{-2}\ s^{-1}$	Φ_{I0} $\mu mol_{(CO2)}\ \mu mol^{-1}_{(photons)}$	R_d $\mu mol_{(CO2)}\ m^{-2}\ s^{-1}$	*N*
CC	A	N1	11.9 ± 2.3	1018 ± 102	0.078 ± 0.005	1.40 ± 0.18	8
		N2	11.4 ± 2.3	1146 ± 102	0.047 ± 0.005	1.58 ± 0.18	8
		N3	16.1 ± 2.5	1487 ± 109	0.062 ± 0.005	1.51 ± 0.19	7
	B	N1	14.2 ± 2.3	1112 ± 102	0.084 ± 0.005	1.25 ± 0.18	8
		N2	18.5 ± 2.5	1556 ± 109	0.069 ± 0.005	1.79 ± 0.19	7
		N3	18.4 ± 2.5	1562 ± 109	0.066 ± 0.005	1.69 ± 0.19	7
SCC	A	N1	24.7 ± 2.5	1791 ± 109	0.090 ± 0.005	2.04 ± 0.19	7
		N2	33.7 ± 2.3	1926 ± 102	0.089 ± 0.005	2.48 ± 0.18	8
		N3	36.1 ± 2.7	1950 ± 118	0.078 ± 0.006	2.98 ± 0.20	6
	B	N1	26.6 ± 2.3	1891 ± 102	0.079 ± 0.005	2.16 ± 0.18	8
		N2	29.7 ± 2.5	1900 ± 109	0.076 ± 0.005	2.44 ± 0.19	7
		N3	30.5 ± 2.3	1749 ± 102	0.080 ± 0.005	2.90 ± 0.18	8

N represents the number of plants under CC and SCC. CC, controlled conditions; SCC, semicontrolled conditions.

3.3.2. Relationship between specific leaf nitrogen and maximal rate of CO_2 assimilation

The maximum net rate of CO_2 assimilation (A_{max}) may be limited not only by light availability but also by leaf N content (per unit leaf area, i.e., SLN) (Lambers *et al.*, 2008). No relationship was found between A_{max} and SLN under CC, where the mean PPFD was of 400 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$, (Figure 41). A_{max} was positively correlated to SLN under SCC, where the PPFD was comprised between 1000 and 2000 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ (Figure 41).

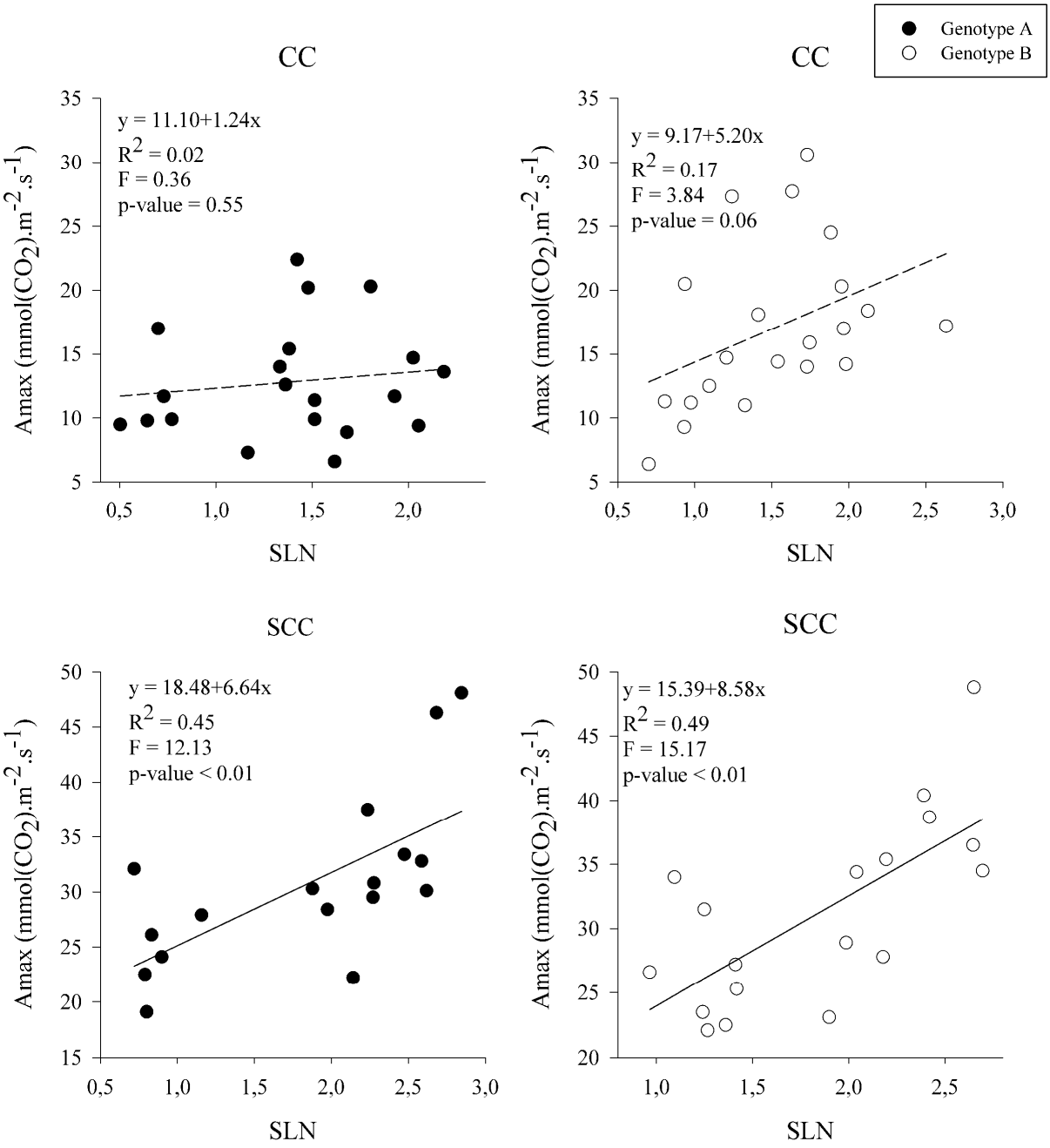


Figure 41 : Relationship between specific leaf nitrogen (SLN, g.m-2) and light-saturated photosynthetic rates (Amax, µmol.m-².s-1) for genotypes A and B in controlled (CC) and semi-controlled conditions (SCC).

3.4. Steviol glycosides composition

Genotype B did not produce RA. For this genotype, N-supply level had no effect on ST proportion (% total content) under CC and SCC. Under FC, ST proportion was significantly lower on site III (Table 20). Regarding genotype A (RA producer) under CC and SCC, the proportion of ST was significantly higher and that of RA significantly lower as SVgly content increased and N content decreased (Table 20 and Figure 42). Under FC, the proportion of ST was significantly higher as SVgly content increased and N content decreased but no significant differences were obtained for the proportion of RA (Table 20 and Figure 42).

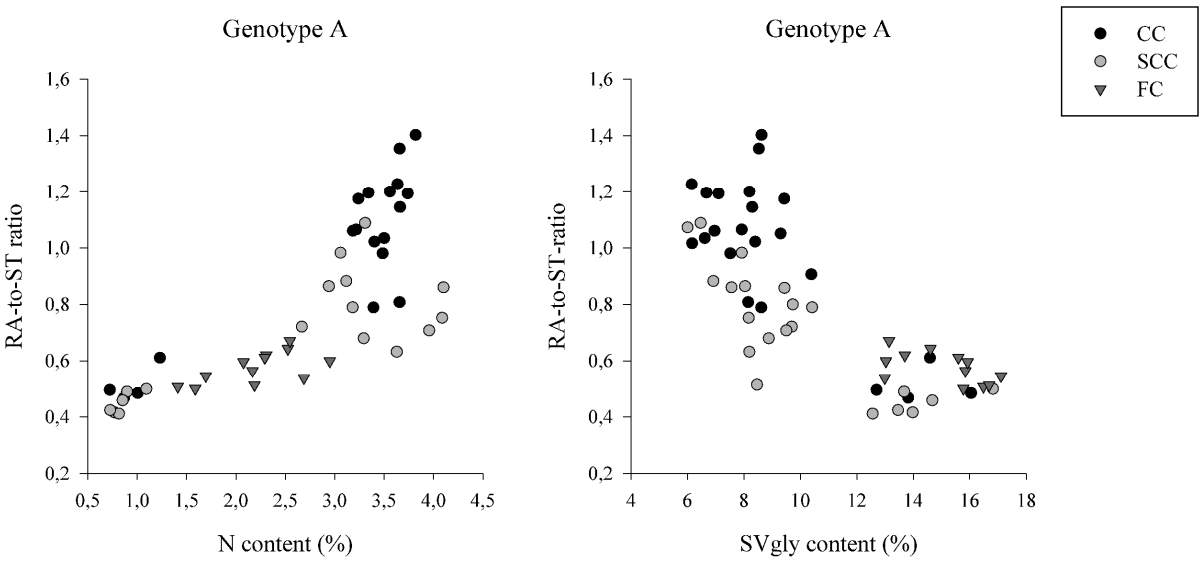


Figure 42: Relationship between nitrogen content in leaves (N content, %) and RA-to-ST ratio and relationship between steviol glycoside content in leaves (SVgly content, %) and RA-to-ST ratio for genotype A in controlled (CC), semi-controlled (SCC) and field conditions (FC).

Table 20 : SVgly proportions (mean ± SEM with SEM calculated from the ANOVA residual mean square with 28 df under CC, 32 df under SCC and 16 df under FC) as affected by genotype (G) = A and B and nitrogen supply (N) = N1, N2, and N3 or location site (LS) = I, II, III, IV.

Growth conditions (GC)	Genotype (G)	Nitrogen supply (N) or Location site (LS)	ST proportion (%)	RA proportion (%)	Minor SVgly proportion (%)	*N*
CC	A	N1	52.8 ± 1.5	33.8 ± 1.9	13.4 ± 0.8	5
		N2	40.9 ± 1.3	44.7 ± 1.6	14.4 ± 0.7	7
		N3	41.0 ± 1.3	44.7 ± 1.6	14.3 ± 0.7	7
	B	N1	85.8 ± 1.4	0.0	14.2 ± 0.8	6
		N2	86.2 ± 1.2	0.0	13.8 ± 0.7	8
		N3	86.0 ± 1.3	0.0	14.0 ± 0.7	7
SCC	A	N1	58.7 ± 1.3	28.7 ± 1.6	12.6 ± 0.7	7
		N2	44.5 ± 1.2	40.0 ± 1.5	15.5 ± 0.7	8
		N3	51.1 ± 1.5	35.0 ± 1.9	13.9 ± 0.8	5
	B	N1	89.6 ± 1.2	0.0	10.4 ± 0.7	8
		N2	87.8 ± 1.2	0.0	12.2 ± 0.7	8
		N3	85.9 ± 1.2	0.0	14.1 ± 0.7	8
FC	A	I	56.5 ± 0.8	29.3 ± 0.8	14.3 ± 0.9	3
		II	55.6 ± 0.8	31.0 ± 0.8	13.4 ± 0.9	3
		III	49.9 ± 0.8	32.0 ± 0.8	18.0 ± 0.9	3
		IV	52.2 ± 0.8	30.6 ± 0.8	17.2 ± 0.9	3
	B	I	84.6 ± 0.8	0.0	15.4 ± 0.9	3
		II	83.2 ± 0.8	0.0	16.7 ± 0.9	3
		III	80.0 ± 0.8	0.0	20.1 ± 0.9	3
		IV	83.6 ± 0.8	0.0	16.2 ± 0.9	3

N represents the number of plants under CC and SCC, and the number of plots under FC. CC, controlled conditions; SCC, semicontrolled conditions; FC, Field conditions.

4. DISCUSSION

The present study focused on growth and SVgly accumulation in two contrasted *S. rebaudiana* genotypes under different growth conditions (CC, SCC, FC) and with different levels of N fertilization. Plants grown under CC were under suboptimal light intensity (PPFD 400 µmol $m^{-2} s^{-1}$). The same experiment was replicated under non limiting natural light intensity in SCC (PPFD 1000-2000 µmol $m^{-2} s^{-1}$). The experiment under field conditions (FC) was used to validate the CC and SCC observations under more realistic conditions of production. Whatever the growth conditions were, low N content in leaves was correlated to a decrease in leaf biomass and an increase in SVgly content. Moreover, this relationship was globally maintained in both genotypes.

Under CC and SCC, SLN was decreased by as much as 50%, whereas photosynthetic activity was less impaired. A_{max} decreased by 25% under CC and by 13%–32% under SCC. This suggests that, when N availability is limited, carbohydrate allocation promotes the accumulation of SVglys, which is consistent with the carbon-nutrient-balance hypothesis (Bryant *et al.*, 1983; Herms and Mattson, 1992). The SVgly pathway is very active in the leaves of *S. rebaudiana*: in our study SVglys accumulated in leaves at concentrations ranging from 6% to 18% on a dry-mass basis and they may accumulate up to 30% (Richman *et al.*, 1999). Thus, a very large part of the *S. rebaudiana* metabolism is committed to the synthesis of these molecules. In contrast, gibberellins such as GA_{20} are present in *S. rebaudiana* leaves at concentrations of 1.2 µg/kg fresh biomass, which is more than 1/10,000 less than SVglys (Alves and Ruddat, 1979). SVgly pathway might be in competition with other pathways issued from the MEP, that lead to the synthesis of key isoprenoids, such as gibberellins, chlorophylls, and carotenoids. Considering the involvement of photosynthesis and NO_3^- availability in regulating the MEP pathway (Ward *et al.*, 2011), this pathway may be diverted from the synthesis of major components, such as chlorophylls, to the synthesis of SVglys when N is limited.

Plants responded to the low light intensity under CC (PPFD 400 µmol $m^{-2} s^{-1}$) by decreasing their A_{max}, in comparison to those grown under SCC (PPFD 1000-2000 µmol $m^{-2} s^{-1}$). This disrupted the relationship between A_{max} and SLN and thus, despite increasing N-supply, no differences were observed in plant biomass under CC. In consequence, this limiting condition was expected to lower the C/N ratio and to lead to a

decrease in C-based secondary metabolites (Cronin and Hay, 1996). However, for both genotypes, no differences were obtained in SVgly content between CC and SCC (Table 18). Further investigations are necessary to establish the effect of light intensity on the MEP pathway and on SVgly accumulation in *S. rebaudiana* leaves.

The increase in SVgly content generally compensated the decrease in leaf biomass under controlled conditions (CC and SCC). However, under field conditions this effect was not sufficient, and the higher yield of SVglys (g pl^{-1}) was achieved when environmental conditions favored biomass accumulation. The LMR is also a valuable parameter for improving leaf yield and thus *S. rebaudiana* productivity. Previous studies showed that there are useful levels of genotypic variability for this parameter (Brandle and Rosa, 1992). In the present study, the LMR was mainly affected by genotype, but this component tended to decrease as plant biomass increased.

SVgly composition is a determining factor of the quality of *S. rebaudiana* extracts, and this can be assessed by using the RA-to-ST ratio. For the RA-containing genotype (A), the RA-to-ST ratio decreased with increased SVgly accumulation (Figure 42). This result suggests that the activity of UGT76G1, which facilitates the conversion of ST to RA, is restricted to a constant but undetermined level (cf. Figure 38). Previous studies indicated the importance of enzymes that, to regulate SVgly synthesis, act prior to the formation of steviol (Kim *et al.*, 1996; Richman *et al.*, 1999; Humphrey *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2011; Kumar H. *et al.*, 2012a). However, the limiting activity of glycosyltransferases acting on the proportion of individual SVglys is less clear. Transition from long days to short days has been shown to accelerate the accumulation of RA and thus to increase the RA-to-ST ratio, in parallel with an up-regulation of UGT74G1 and UGT76G1 (Mohamed *et al.*, 2011). RA might also be formed from rebaudioside B through the activity of UGT74G1 (Richman *et al.*, 2005). In general, it is difficult to correlate a specific substrate with a specific derivative, because glycosyltransferases are thought to be highly region specific rather than substrate specific (Jones and Vogt, 2001). Thus, determining the best level of N supply to optimize SVgly content and composition depends on a better understanding of its effect on UGTs activity.

This study has shown that *S. rebaudiana* can respond adaptively to low N assimilation by decreasing its growth rate while increasing the SVgly content in its leaves. However, in field the main parameter for the SVgly yield remains the biomass production, favored by N supply.

In more sustainable agricultural systems, this relationship could also be considered to find the best compromise between leaf biomass and SVgly concentration. In addition, the extraction of SVglys in more concentrated leaves implies less waste water. SVgly composition might also be affected, albeit in a lesser extent, by low N content in the leaves: the RA-to-ST ratio tended to decrease with increasing SVgly accumulation, suggesting a limiting role of this step in the glycosylation pathway.

Conclusion de la Partie 3

CONCLUSION DE LA PARTIE 3

Les résultats présentés dans cette partie ont permis d'apporter des éléments de réponse pour la définition d'itinéraires techniques en vue d'une culture de *S. rebaudiana* en milieu tempéré. Un effet positif des jours longs sur l'élaboration de la biomasse foliaire et sur l'accumulation en SVglys a été noté. Le rendement de *S. rebaudiana* pourrait alors être favorisé par une implantation précoce des plantes en champ, qui permettrait le développement des feuilles sous des jours longs. Ces résultats suggèrent également des critères de sélection à prendre en compte : des plantes au démarrage précoce et au port ramifié, pouvant produire un nombre important de feuilles dès leur démarrage, seraient à cibler. De plus, *S. rebaudiana* peut répondre positivement à une faible fertilisation azotée, en réduisant sa biomasse et en augmentant son accumulation en SVglys. Une carence azotée peut néanmoins avoir un effet négatif sur la composition en SVglys, en entraînant une diminution du ratio RA/ST. Ce dernier paramètre est à prendre en compte pour la qualité du produit final.

L'ensemble des résultats suggère également un effet du métabolisme carboné, et de son interaction avec le métabolisme azoté des feuilles, sur la production de biomasse foliaire (métabolisme primaire) et sur l'accumulation en SVglys (métabolisme secondaire). Ainsi une régulation complexe de la voie du MEP et de ses produits, selon le statut azoté et carboné de la feuille, pourrait avoir lieu chez *S. rebaudiana*. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour évaluer l'effet de la balance carbone-azote sur la voie de MEP, sur l'accumulation en SVglys et sur la relation entre la production de biomasse et la teneur en SVglys.

Les expériences conduites sur les cinétiques d'accumulation des SVglys ont montrent que leur composition reste relativement stable selon les différentes conditions de croissance, alors que les résultats portant sur les effets de la fertilisation montrent l'impact négatif d'une carence azotée sur le ratio RA/ST. Ainsi, dans des environnements peu contrastés, la composition en SVglys est relativement stable, alors qu'elle varie sous conditions limitantes. Dans tous les cas, la variabilité de la teneur totale en SVglys est plus élevée que celle des proportions individuelles des SVglys. Ces résultats suggèrent que les enzymes intervenant avant la formation du stéviol sont plus sensibles aux fluctuations environnementales que les glycosyltransferases (UGT), intervenant ultérieurement. L'activité de ces dernières pourrait néanmoins varier sous des conditions environnementales contrastées.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les résultats de ce travail de thèse ont montré des sources de variabilité génotypique et environnementale pour l'accumulation des SVglys chez *S. rebaudiana*, et suggèrent des mécanismes de régulation biochimique et génétique complexes de leur voie de biosynthèse. Des effets du génotype, de l'environnement et de leurs interactions ont aussi été obtenus pour l'élaboration de la biomasse, laissant entrevoir des possibilités de sélection en vue d'une culture de *S. rebaudiana* en milieu tempéré.

1. Voie de biosynthèse des glycosides de stéviol et mécanismes de régulation

Les résultats obtenus en conditions contrôlées ont suggéré l'importance du statut carboné et azoté de la feuille dans la régulation de la voie de biosynthèse des SVglys. Au cours des dernières années, des études ont montré l'importance de la photosynthèse, comme source de carbone, dans la régulation de la voie du MEP (Hemmerlin, 2013 ; Banerjee et Sharkey, 2014). Il a également été montré chez *A. thaliana* que l'activité d'une enzyme clé de la voie du MEP, l'enzyme HDR, ne dépendait pas seulement du flux de carbone issu de la photosynthèse, mais aussi d'un système de détection du NO_3^- (Ward *et al.*, 2011). Ainsi, une régulation complexe de la voie du MEP et de ses produits pourrait avoir lieu selon le statut azoté et carboné des feuilles chez *S. rebaudiana*.

Une compétition entre la synthèse des SVglys (métabolisme secondaire) et l'élaboration de la biomasse (métabolisme primaire) a également été observé. Au-delà de la synthèse des SVglys, la voie du MEP prend en charge la synthèse des pigments photosynthétiques (chlorophylles, caroténoïdes) et d'hormones (gibbérellines, acide abscissique) (Cordoba *et al.*, 2011). Les SVglys sont accumulés à des concentrations élevées dans les feuilles de *S. rebaudiana*. Leur voie de biosynthèse doit donc nécessiter une quantité importante de substrats et d'enzymes et pourrait être en concurrence avec la synthèse d'isoprénoïdes clés, favorisant la croissance de la plante, telles que les gibbérellines ou les chlorophylles (Guleria *et al.*, 2014).

Sous nos conditions expérimentales, la teneur en SVglys dans les feuilles a augmenté sur une courte période lors de l'initiation de la feuille (1 à 2 semaines), puis est restée stable. Ces résultats ont été obtenus sur un génotype seulement. Une étude sur plusieurs génotypes permettrait de distinguer les principes généralement applicables des réponses spécifiques des génotypes, concernant les mécanismes d'accumulation des SVglys. Ces résultats ouvrent néanmoins des pistes à explorer quant aux mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des SVglys.

(i) La voie pourrait être toujours active alors que la teneur en SVglys reste stable. Il y aurait alors un turnover des SVglys. Cette hypothèse pourrait être testée par une expérience de marquage au $^{13}CO_2$, méthode déjà utilisée avec succès dans les études de Romisch-Margl *et al.* (2007) et Schramek *et al.* (2010), sur des feuilles pleinement développées, dont la teneur en SVglys est stable.

(ii) La voie pourrait ne plus être active une fois que la teneur est stable, les SVglys accumulés restant stockés dans la vacuole. Il y aurait alors une régulation de la voie, pouvant être due soit à un manque de précurseurs après la période initiale d'accumulation, entraînant une faible activité des enzymes, soit à une inhibition des enzymes ou des gènes codant pour ces enzymes, soit à une dégradation des enzymes. Si de tels mécanismes de régulation existent, la phase d'accumulation en SVglys pourrait être prolongée, en empêchant la dégradation ou l'inhibition des enzymes, ou en stimulant leur activité.

L'identification des mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des SVglys et de leur devenir permettrait d'appréhender leur accumulation d'un point de vue mécanistique, en vue d'un travail de modélisation de l'élaboration de leur rendement. De tels outils ont déjà été développés, sous forme de modèles génériques de croissance des plantes, tels que le modèle PLATHO (Gayler and Priesack, 2007), ou pour l'étude de plantes spécifiques, comme *Artemisia annua* (Lommen *et al.*, 2008).

Au cours des expériences réalisées en conditions contrôlées, la teneur en SVglys dans les feuilles a été plus élevée sous jours longs (16 h) que sous jours courts (8 h), suggérant un effet marqué de la longueur du jour sur la capacité d'accumulation en SVglys des feuilles. Ce phénomène n'a néanmoins pas été observé en champ : la teneur en SVglys est restée stable entre les stades « végétatif » (V) et « bouton floral » (BF) pour les trois génotypes étudiés,

quelle que soit leur précocité. Une nette augmentation de la biomasse foliaire a pourtant été observée entre les stades V et BF pour le génotype le plus tardif. Une part non négligeable de sa biomasse foliaire s'est donc établie sous des jours plus courts. L'effet de la longueur de jour sur l'accumulation en SVglys a alors pu être compensé par d'autres facteurs, environnementaux ou génotypiques, en champ. Le plus faible écart de longueur de jour entre la période « implantation-V » (15,5 à 14h) et la période « V-BF » (14 à 12 h), par rapport aux écarts étudiés en conditions contrôlées, pourrait également expliquer l'absence de déclin de la teneur en SVglys au stade BF pour le génotype le plus tardif.

En champ, le déclin de la teneur en SVglys à la floraison (F) a généralement été accompagné d'une dégradation du ST et du RA en SVB et RB respectivement. Ce phénomène a été variable selon le génotype et le site d'expérimentation. Il a été plus marqué sur les plantes présentant des symptômes foliaires de maladies importants, suggérant une dégradation des SVglys en fin de cycle par des β-glycosidases exogènes d'origine bactérienne ou fongique, plutôt que par des β-glycosidases endogènes, comme suggéré par Madore (2000).

Au cours de l'ensemble des expérimentations, la variabilité de la teneur totale en SVglys a été plus élevée que celle des proportions individuelles des SVglys. Un effet marqué de l'environnement sur la composition en SVglys a été observé en conditions limitantes seulement. Ces résultats suggèrent un déterminisme génotypique plus élevé pour la composition que pour la teneur totale en SVglys. Les glycosyltransferases (UGT) intervenant après la formation du stéviol seraient alors moins sensibles aux fluctuations environnementales que les enzymes intervenant avant. Leur activité peut néanmoins être limitante dans des conditions extrêmes, entraînant des variations de composition en SVglys.

Dans le cas d'une carence azotée, une diminution du ratio RA/ST a été observée, en parallèle d'une augmentation de la teneur totale en SVglys. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène : soit le potentiel maximum de l'UGT76G1 (concentration, activité) a été atteint et l'enzyme ne peut pas glycosyler le ST au rythme auquel il est synthétisé, entraînant une diminution du ratio RA/ST, soit l'activité de l'enzyme est limitée par un manque de disponibilité en glucose activé. L'étude de ce phénomène mériterait d'être approfondie, car il pourrait être limitant pour l'optimisation du rendement en RA.

Le travail de caractérisation de la variabilité génotypique a mis en évidence une grande variabilité de composition en SVglys et a notamment montré l'absence du RF dans les génotypes ne contenant pas de RA et de RC, suggérant une large spécificité de substrat de l'UGT76G1. Dans ce cas, la perte de fonctionnalité de cette UGT (Yang *et al.*, 2014) pourrait empêcher l'ensemble ou une large part des glycosylations postérieures des SVglys. Un tri précoce des plantes selon la fonctionnalité de cette UGT devrait être réalisé dans le cadre d'un programme de sélection variétale.

2. Sélectionner et cultiver *S. rebaudiana* en milieu tempéré

Les résultats de ces travaux ont montré un effet de l'environnement, du génotype et de leurs interactions pour l'élaboration du rendement final. Ils permettent d'apporter des premiers éléments de réponse pour la définition d'itinéraires techniques en vue d'une culture de *S. rebaudiana* en milieu tempéré.

(i) En conditions contrôlées, les plantes ont répondu positivement à une faible fertilisation azotée en augmentant leur accumulation de SVglys, ce qui a contrebalancé le déclin de biomasse associé. Néanmoins en champ, le facteur déterminant pour l'élaboration du rendement semble bien être la production de biomasse. L'augmentation de la teneur en SVglys en conditions contrôlées a également été associée à une diminution du ratio RA/ST. Des résultats contradictoires aux nôtres ont été obtenus dans l'étude de Tavarini *et al.* (2015), où un apport élevé d'azote a favorisé l'élaboration de la biomasse et l'accumulation en SVglys, ainsi que le ratio RA/ST. L'étude de l'effet de la fertilisation sur l'élaboration du rendement de *S. rebaudiana* nécessiterait d'être approfondie sur plusieurs génotypes afin d'apporter des conclusions généralement applicables.

(ii) Un effet positif de la longueur du jour sur l'élaboration de la biomasse foliaire et sur l'accumulation en SVglys a été observé, en accord avec les résultats obtenus par Métivier et Viana (1979), incitant à une implantation précoce des plantes en champ sous nos climats, qui permettrait le développement des feuilles sous jours longs.

(iii) En accord avec les résultats obtenus dans la littérature (Zaidan *et al.*, 1980 ; Bian, 1981 ; Vanidze *et al.*, 2009 ; Ceunen *et al.*, 2011), la teneur en SVglys a diminué ou stagné à la floraison. L'optimum de récolte a été atteint au stade BF, quelle que soit la précocité du génotype et la longueur de jour sous laquelle il a atteint ce stade.

(iv) En deuxième année de culture, la teneur en SVglys des plantes a généralement augmenté, de manière plus ou moins prononcée selon le génotype. Des résultats similaires ont été obtenus dans l'étude de Pal *et al.* (2015), soulignant l'intérêt d'une culture pluriannuelle de *S. rebaudiana* sous nos climats.

(v) La survie des plantes à l'hiver a été la plus élevée et le développement de symptômes de maladies foliaire le plus faible sur les sites les mieux drainés, suggérant une sensibilité de *S. rebaudiana* aux excès d'eau, qui pourrait être due à un stress oxydatif des racines (Pena-Castro, 2014). Une étude plus approfondie de la physiologie de la plante serait importante pour comprendre sa réponse à l'eau.

Ces résultats soulignent l'importance de certains critères, dont il faudrait tenir compte en vue d'un travail de sélection variétale. Un port « buissonnant » et la précocité de démarrage des plantes en champ sont à rechercher, en vue d'obtenir un nombre élevé de feuilles développées sous jours longs. Une floraison tardive apparaît également comme un critère d'importance en vue de favoriser la durée de la période végétative. La sensibilité des plantes aux maladies, aux excès d'eau et leur capacité de survie à l'hiver sont aussi à prendre en compte. Enfin, la composition en SVglys, variable selon le génotype et peu influencée par l'environnement, est un critère d'importance pour l'aspect qualitatif du rendement. La teneur totale en SVglys, plus fluctuante selon l'environnement, semble être un caractère moins déterminant pour distinguer les génotypes entre eux.

Le développement d'une méthode de mesure indirecte rapide et à moindre coût de la teneur et de la composition en SVglys faciliterait les programmes de sélection variétale. La spectrométrie proche infra-rouge (SPIR) est une méthode couramment utilisée pour déterminer la teneur en métabolites secondaires dans les plantes (Montes *et al.*, 2013 ; Pissard *et al.*, 2013). Elle permettrait de réaliser un screening rapide des plantes en vue d'un travail de sélection variétale de *S. rebaudiana*. Des modèles décrits dans la littérature ont permis d'estimer les teneurs des principaux SVglys (Hearn et Subedi, 2009 ; Yu *et al.*, 2011). Un travail en vue du développement d'un modèle par SPIR, non présenté ici, a été étudié par nos équipes.

Les expériences de ce travail de thèse n'ont été réalisées que sur des clones obtenus par propagation végétative, et le matériel de propagation adéquat, graines ou plants, n'est pas encore arrêté. Les schémas de sélection à envisager dépendront du mode de propagation retenu. Dans le cas d'une propagation sexuée de *S. rebaudiana*, la production de lignées pures en vue du développement d'hybrides paraît difficilement envisageable, compte-tenu de l'auto-incompatibilité de cette plante. Les mécanismes moléculaires de l'auto-incompatibilité sporophytique chez les *Asteraceae* sont néanmoins peu connus (Allen *et al.*, 2011) et restent à explorer pour *S. rebaudiana*. La sélection récurrente permettrait de conserver une large variabilité génétique et conduirait à l'obtention de plantes améliorées, adaptées à nos conditions de culture. Le passage à la voie asexuée (boutures) pourrait alors permettre d'associer des structures génétiques performantes et complémentaires dans des cultivars synthétiques issus de brassage.

Dans une optique de propagation asexuée de *S. rebaudiana*, une amélioration des plantes par sélection phénotypique de plantes individuelles pourrait être envisagée. Un tel programme de sélection nécessiterait au préalable un brassage de plantes aux caractéristiques d'intérêt, afin d'obtenir des phénotypes performants sous nos climats.

En parallèle de la mise en place d'un programme de sélection variétale, l'identification et la validation de caractères adaptés à la description de l'espèce serait nécessaire, dans une optique d'évaluation variétale. Le travail de description phénotypique réalisé ici a permis d'identifier une variabilité entre les génotypes suffisante pour établir des distinctions sur des critères morphologiques et de précocité. Un travail plus approfondi serait dorénavant nécessaire, afin de proposer des caractères pouvant être décrits et reconnus avec précision. Il faudrait également évaluer ces caractères sur plusieurs sites pendant plusieurs années, afin d'évaluer leur robustesse.

Liste des figures

FIGURE 1: (A) PIED EN REPRISE DE VEGETATION A LA SORTIE DE L'HIVER ; (B) FEUILLES ; (C) FLEURS ; (D) AKENE FERTILE DE *S. REBAUDIANA.* 23
FIGURE 2 : STRUCTURE MORPHOLOGIQUE DES PLANTES UTILISEES POUR LA DESCRIPTION DES STADES DE DEVELOPPEMENT: (A) SEMIS EN COURS DE DEVELOPPEMENT ; (B) SEMIS NORMAL LORS D'UN TEST DE GERMINATION ; (C) SEMIS DEVELOPPE AVEC SYSTEME RACINAIRE ; (D) PLANTE DEVELOPPEE CONDUITE EN JOURS COURTS ; (E) REPOUSSE DE TIGE APRES TAILLE DE LA PLANTE ; (F_1) PANICULE DE CORYMBES AVEC DIVERS CAPITULES ; (F_2) CYME DETACHEE AU HASARD POUR COMPTER LES STADES REPRODUCTIFS ; (F_3) CAPITULE CONTENANT CINQ FLEURS BLANCHES ; (F_4) CAPITULE CONTENANT DES GRAINES PRETES A ETRE DISPERSEES (CARNEIRO, 2007). 25
FIGURE 3: (A) JEUNE PLANT DE *S. REBAUDIANA* EN COMPETITION AVEC DU LISERON ; (B) ET (C) SYMPTOMES FOLIAIRES DE MALADIES FONGIQUES OBSERVES CHEZ *S. REBAUDIANA.* 31
FIGURE 4: CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES QUATRE GROUPES DE PLANTES OBTENUS DANS L'ETUDE DE TATEO *ET AL.* (1998). 39
FIGURE 5: (A) NOYAU DE STEVIOL ET (B) STRUCTURE COMMUNE AUX GLYCOSIDES DE STEVIOL. 43
FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE DU MEP, CONDUISANT A LA FORMATION DES SVGLYS. 52
FIGURE 7: VOIE DU DU 2-C-METHYL-D-ERYTHRITOL 4-PHOSPHATE (MEP), CONDUISANT A LA FORMATION DE LA GERANYLGERANYLDIPHOSPHATE. 54
FIGURE 8: VOIE DE BIOSYNTHESE DU STEVIOL ET DES PRINCIPAUX GLYCOSIDES DE STEVIOL A PARTIR DE LA GERANYLGERANYLDIPHOSPHATE. 55
FIGURE 9: VOIE DE BIOSYNTHESE DU STEVIOL ET DE SES GLYCOSIDES CONDUISANT A LA FORMATION DU RA (FLECHES PLEINES) ET MODELE PROPOSANT UNE VOIE CONDUISANT A LA FORMATION DU RC (BRANDLE, 1999) (FLECHES EN POINTILLES). 58
FIGURE 10: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ORGANISATION SPATIALE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES GLYCOSIDES DE STEVIOL, ADAPTATION DU GRAPHIQUE DE HUMPHREY *ET AL.* (2006). 60
FIGURE 11: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ETAPES DE LA VOIE DU MEP JUSQU'A LA FORMATION DES SVGLYS POUVANT AVOIR UN ROLE CLE POUR LA REGULATION DE L'ACCUMULATION EN SVGLYS. 61
FIGURE 12: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PRINCIPAUX GLYCOSIDES DE STEVIOL. 71
FIGURE 13: (A) BOUTURES AVANT ENRACINEMENT; (B) BOUTURES APRES ENRACINEMENT ; (C) BOUTURES REMPOTEES EN GODET AVANT TRANSPLANTATION AU CHAMP. 84
FIGURE 14: SYMPTOMES FOLIAIRES DE MALADIES CHEZ S. REBAUDIANA. (A) FEUILLES CHLOROSEES PORTANT DES NECROSES ; (B) FEUILLES NON CHLOROSEES PORTANT DES NECROSES. 85
FIGURE 15: PHOTOGRAPHIES DES QUATRE PARCELLES D'ESSAI. 87
FIGURE 16: PHOTOGRAPHIE (A) DU TUNNEL, CONDITIONS SEMI-CONTROLEES (SCC) ; (B) DE LA CHAMBRE DE CULTURE, CONDITIONS SEMI-CONTROLEES (SCC). 88
FIGURE 17 : SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE MAIN STEVIOL GLYCOSIDES. 100
FIGURE 18 : BIOSYNTHETIC PATHWAY OF STEVIOSIDE AND ITS GLYCOSIDES LEADING TO REBAUDIOSIDE A. 101
FIGURE 19 : BIPLOT OBTAINED FROM THE PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS, PERFORMED ON 96 GENOTYPES (SITE III) AND BASED ON PROPORTIONS OF THE MAIN SVGLYS, EXPRESSED IN PERCENTAGE OF TOTAL SVGLY CONTENT. 105
FIGURE 20 : HIERARCHICAL CLUSTERING RESULTS. 106
FIGURE 21 : SVGLY CONTENT (MG.G^{-1} DM; MEAN ± SEM) AND INDIVIDUAL SVGLY PROPORTIONS (% OF SVGLY TOTAL CONTENT; MEAN ± SEM) IN ONE-YEAR OLD (PLANTED IN 2012 & 2013) AND TWO-YEAR OLD (PLANTED IN 2012) GENOTYPES OF *S. REBAUDIANA* ON SITES III & IV (PA: PLANT AGE). 107
FIGURE 22: DESCRIPTION DE LA MORPHOLOGIE DES FEUILLES. 112
FIGURE 23 : HISTOGRAMME DE REPARTITION DES 96 GENOTYPES DE LA POPULATION DE *S. REBAUDIANA* ETUDIEE, SELON LEUR CARACTERISTIQUES FOLIAIRES : TAILLE ; MDWSR, COULEUR. 114
FIGURE 24 : HISTOGRAMMES DES PROPORTIONS SUR LES CRITERES DE PORT DE PLANTES (BUISSONNANT, PEU RAMIFIE) ET DE PRECOCITE (PRECOCE, INTERMEDIAIRE, TARDIF) POUR LES 96 GENOTYPES DE LA POPULATION DE *S. REBAUDIANA* ETUDIEE... 115

FIGURE 25 : HISTOGRAMME DES EFFECTIFS DES 96 GENOTYPES DE LA POPULATION DE *S. REBAUDIANA* ETUDIEE POUR UNE NOTE ALLANT DE DE 1 A 10, SELON LA RESISTANCE DES GENOTYPES AUX MALADIES ET INTEMPERIES. 116
FIGURE 26 : VALEUR MOYENNE ET ECART-TYPE DE LA PROPORTION DE RA SELON LA COULEUR DES FEUILLES CHEZ LES 96 GENOTYPES DE LA POPULATION DE *S. REBAUDIANA* ETUDIEE. 117
FIGURE 27 : PHOTOGRAPHIE DES TROIS GENOTYPES A, B ET C. 123
FIGURE 28 : BIOMASSE DE LA PLANTE (G; MOYENNE ± SEM), LMR (LEAF MASS RATIO, %; MOYENNE ± SEM) ET BIOMASSE FOLIAIRE (G/PLANTE; MOYENNE ± SEM) DES GENOTYPES A, B ET C SUR LES SITES EXPERIMENTAUX I, II, III ET IV SELON LE STADE DE PRELEVEMENT. 129
FIGURE 29 : TENEUR EN SVGLYS (MG.G^{-1}; MOYENNE ± SEM) ET PROPORTION INDIVIDUELLE DES DIFFERENTS SVGLYS (%; MOYENNE ± SEM) DES GENOTYPES A, B ET C SUR LES SITES EXPERIMENTAUX I, II, III ET IV SELON LE STADE DE PRELEVEMENT. 130
FIGURE 30 : RELATION ENTRE LA QUANTITE DE ST (µMOL) ET LA QUANTITE DE SVB (µMOL) DES GENOTYPES A, B ET C ET RELATION ENTRE LA QUANTITE DE RA (µMOL) ET LA QUANTITE DE RB (µMOL) DES GENOTYPES A ET C SUR LES SITES EXPERIMENTAUX I, II, III ET IV AUX STADES BOUTON FLORAL ET FLORAISON. 132
FIGURE 31 : RENDEMENT EN SVGLYS (G; MOYENNE ± SEM) DES GENOTYPES A, B ET C SUR LES SITES EXPERIMENTAUX I, II, III ET IV SELON LE STADE DE PRELEVEMENT (V, VEGETATIF ; BF, BOUTON FLORAL ; F, FLORAISON). 132
FIGURE 32 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU STEVIOSIDE (ST), DU STEVIOLBIOSIDE (SVB), DU REBAUDIOSIDE A (RA) ET DU REBAUDIOSIDE B (RB). 134
FIGURE 33 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS PRELEVEMENTS (S1 A S4), DU STADE DE DEVELOPPEMENT DE PLANTES A CHAQUE PRELEVEMENT SELON LE TRAITEMENT (T1 A T3), ET DU MODE D'ECHANTILLONNAGE (3 A 6 ETAGES FOLIAIRES, BRACTEES ET TIGES EGALEMENT PRELEVEES). 148
FIGURE 34 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS PRELEVEMENTS (S1 A S4), DU STADE DE DEVELOPPEMENT DE PLANTES A CHAQUE PRELEVEMENT SELON LE TRAITEMENT (T1 A T3), ET DU MODE D'ECHANTILLONNAGE (3 A 8 ETAGES FOLIAIRES). ... 149
FIGURE 35: TENEUR EN SVGLYS (µMOL.G^{-1}; MOYENNE ± SEM) DU GENOTYPE A LORS DE L'ESSAI 1, SELON LE TRAITEMENT PHOTOPERIODIQUE (T1, T2 ET T3), L'ETAGE FOLIAIRE (1 A 6 ; B, BRACTEES) ET LA DATE DE PRELEVEMENT (S1, J0 ; S2, J15 ; S3, J30 ; S4, J45). 151
FIGURE 36 : ACCUMULATION EN SVGLYS (µMOL.G^{-1} ; MOYENNE ± SEM) LORS DE L'ESSAI 2, SELON LE TRAITEMENT PHOTOPERIODIQUE (T1, T2 ET T3), L'ETAGE FOLIAIRE (1 A 8) ET LA DATE DE PRELEVEMENT (S1, J0 ; S2, J14 ; S3, J21 ; S4, J28). 152
FIGURE 37: PROPORTION INDIVIDUELLE DES DIFFERENTS SVGLYS (%; MOYENNE ± SEM) DU GENOTYPE A LORS DES ESSAIS 1 ET 2, SELON LE TRAITEMENT PHOTOPERIODIQUE (T1, T2 & T3), L'ETAGE FOLIAIRE (1 A 6 ET BRACTEES POUR L'ESSAI 1 ; 1 A 8 POUR L'ESSAI 2) ET LA DATE DE PRELEVEMENT (S1, S2, S3 ET S4). 155
FIGURE 38: BIOSYNTHETIC PATHWAY OF STEVIOL AND ITS GLYCOSIDES LEADING TO REBAUDIOSIDE A. 167
FIGURE 39 :SPECIFIC LEAF NITROGEN (SLN, G.M^{-2}; MEAN±SE) AND NITROGEN CONTENT IN LEAVES (N CONTENT, %; MEAN±SE) FOR GENOTYPES A AND B IN CONTROLLED (CC), SEMI-CONTROLLED (SCC) AND FIELD CONDITIONS (FC) AT DIFFERENT LEVELS OF FERTILIZATION (N1, N2, N3) OR IN DIFFERENT LOCATION SITES (I, II, III, IV). 175
FIGURE 40: (A) RELATIONSHIP BETWEEN NITROGEN CONTENT IN LEAVES (N CONTENT, %) AND PLANT BIOMASS (G DM) AND (B) RELATIONSHIP BETWEEN N CONTENT (%) AND STEVIOL GLYCOSIDE CONTENT IN LEAVES (SVGLY CONTENT, %) FOR GENOTYPES A AND B IN CONTROLLED (CC), SEMI-CONTROLLED (SCC) AND FIELD CONDITIONS (FC). 176
FIGURE 41 : RELATIONSHIP BETWEEN SPECIFIC LEAF NITROGEN (SLN, G.M-2) AND LIGHT-SATURATED PHOTOSYNTHETIC RATES (AMAX, µMOL.M-^{2}.S-1) FOR GENOTYPES A AND B IN CONTROLLED (CC) AND SEMI-CONTROLLED CONDITIONS (SCC). 180
FIGURE 42: RELATIONSHIP BETWEEN NITROGEN CONTENT IN LEAVES (N CONTENT, %) AND RA-TO-ST RATIO AND RELATIONSHIP BETWEEN STEVIOL GLYCOSIDE CONTENT IN LEAVES (SVGLY CONTENT, %) AND RA-TO-ST RATIO FOR GENOTYPE A IN CONTROLLED (CC), SEMI-CONTROLLED (SCC) AND FIELD CONDITIONS (FC). 181

Liste des tableaux

TABLEAU 1: DESCRIPTION DES STADES DE DEVELOPPEMENT DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI (CARNEIRO, 2007). 24
TABLEAU 2: LISTE DE QUELQUES VARIETES DE *S. REBAUDIANA* EN VUE D'UNE PROPAGATION PAR CLONAGE. 36
TABLEAU 3: LISTE DES GLYCOSIDES DE STEVIOL CONNUS CHEZ *S. REBAUDIANA*. 46
TABLEAU 4: TENEUR EN GLYCOSIDES DE STEVIOL DANS LES DIFFERENTS ORGANES DE LA PLANTE, EXPRIMEE EN VALEUR RELATIVE PAR RAPPORT A LA TENEUR OBSERVEE DANS LES FEUILLES. 51
TABLEAU 5 : CARACTERISTIQUES AGRONOMIQUES DES QUATRE PARCELLES D'ESSAI POUR LES EXPERIMENTATIONS EN CHAMP. 88
TABLE 6 : PROBABILITY VALUES FROM THE THREE-WAY ANOVA ON SVGLY CONTENT (MG/G) AND COMPOSITION (ST, RA & MINORS SVGLYS IN % OF TOTAL SVGLYS) IN LEAVES OF *STEVIA REBAUDIANA* PLANTS ON THE TWO LOCATION SITES. 108
TABLEAU 7: CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES, DE PRECOCITE ET DE TENEUR ET COMPOSITION EN SVGLYS DES 9 GENOTYPES AYANT EU UNE NOTE DE 8/10 OU DE 9/10 POUR LEUR RESISTANCE AUX MALADIES ET INTEMPERIES. 116
TABLEAU 8 : CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES DES GENOTYPES A, B ET C. 123
TABLEAU 9 : CARACTERISTIQUES AGRONOMIQUES, ITINERAIRES TECHNIQUES ET DONNEES CLIMATIQUES DES QUATRE SITES D'ESSAI (CAMPAGNE 2014). 124
TABLEAU 10 : INTENSITE (%) ET FREQUENCE (%) DES SYMPTOMES FOLIAIRES DE MALADIES POUR LES PLANTES DES GENOTYPES A, B ET C SUR LES SITES I, II, III ET IV AU STADE BOUTON FLORAL. 127
TABLEAU 11 : VALEURS MOYENNES DES COMPOSANTES DU RENDEMENT AU STADE BOUTON FLORAL SELON LE GENOTYPE (A, B ET C) ET LE SITE D'EXPERIENCE (I, II, III ET IV). 128
TABLEAU 12 : VALEURS MOYENNES DE LA QUANTITE TOTALE (µMOL) ET QUANTITE INDIVIDUELLES (µMOL) DES SVGLYS SELON LE GENOTYPE (A, B ET C), LE SITE D'EXPERIENCE (I, II, III ET IV) ET LE STADE DE DEVELOPPEMENT (V, VEGEETATIF ; BF, BOUTON FLORAL ; F, FLORAISON). 131
TABLEAU 13: VALEURS MOYENNES DU RATIO RA/ST DU GENOTYPE A LORS DES ESSAIS 1 ET 2, SELON LE TRAITEMENT PHOTOPERIODIQUE (T1, T2 & T3), L'ETAGE FOLIAIRE (1 A 6 ET BRACTEES POUR L'ESSAI 1 ; 1 A 8 POUR L'ESSAI 2) ET LA DATE DE PRELEVEMENT (S1, S2, S3 ET S4). 154
TABLEAU 14: VALEURS MOYENNES DES PARAMETRES POUR L'ELABORATION DE LA BIOMASSE DU GENOTYPE A LORS DE L'ESSAI 1, SELON LE TRAITEMENT PHOTOPERIODIQUE (T1, T2 & T3) ET LA DATE DE PRELEVEMENT (S1, S2, S3 ET S4). 156
TABLEAU 15: VALEURS MOYENNES DE LA TENEUR EN SVGLYS (MG.G^{-1} MS), DU RENDEMENT EN SVGLYS (G/PLANTE), DES PROPORTIONS INDIVIDUELLES DES SVGLYS (% DE LA TENEUR TOTALE) ET DU RATIO RA/ST DU GENOTYPE A LORS DE L'ESSAI 1, SELON LE TRAITEMENT PHOTOPERIODIQUE (T1, T2 & T3) ET LA DATE DE PRELEVEMENT (S1, S2, S3 ET S4). 157
TABLE 16 : COMPOSITION OF FERTILIZING SOLUTION AND QUANTITIES SUPPLIED FOR EXPERIMENTS UNDER CONTROLLED CONDITIONS (CC AND SCC). 170
TABLE 17 : CHARACTERISTIC OF THE FOUR LOCATION SITES FOR EXPERIMENTS UNDER FIELD CONDITIONS. 171
TABLE 18 : YIELD COMPONENTS (MEAN ± SEM WITH SEM CALCULATED FROM THE ANOVA RESIDUAL MEAN SQUARE WITH 28 DF UNDER CC, 32 DF UNDER SCC AND 16 DF UNDER FC) AS AFFECTED BY GENOTYPE (G) = A AND B AND NITROGEN SUPPLY (N) = N1, N2, AND N3 OR LOCATION SITE (LS) = I, II, III, IV. 177
TABLE 19 : PARAMETERS VALUES FOR LIGHT-RESPONSE CURVES (MEAN ± SEM WITH SEM CALCULATED FROM THE ANOVA RESIDUAL MEAN SQUARE WITH 33 DF UNDER CC AND 32 DF UNDER SCC) AS AFFECTED BY GENOTYPE (G) = A AND B AND NITROGEN SUPPLY (N) = N1, N2, AND N3. 179
TABLE 20 : SVGLY PROPORTIONS (MEAN ± SEM WITH SEM CALCULATED FROM THE ANOVA RESIDUAL MEAN SQUARE WITH 28 DF UNDER CC, 32 DF UNDER SCC AND 16 DF UNDER FC) AS AFFECTED BY GENOTYPE (G) = A AND B AND NITROGEN SUPPLY (N) = N1, N2, AND N3 OR LOCATION SITE (LS) = I, II, III, IV. 182

Références bibliographiques

A

Abdullateef, R.A., Osman, M., 2011. Effects of Visible Light Wavelengths on Seed Germinability in *Stevia Rebaudiana* Bertoni. International Journal of Biology 3, 83-91.

AFSSA 2009. Arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire. Texte 6 (JORF 6/09/2009). Journal Officiel de la Republique Française: AFSSA.

Aladakatti, Y.R., Palled, Y.B., Chetti, M.B., Halikatti, S.I., Alagundagi, S.C., Patil, P.L., Patil, V.C., Janawade, A.D., 2012. Effect of nitrogen, phosphorus and potassium levels on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.)*. Karnataka Journal of Agricultural Sciences 25, 25-29.

Allen, A.M., Thorogood, C.J., Hegarty, M.J., Lexer, C., Hiscock, S.J., 2011. Pollen-pistil interactions and self-incompatibility in the *Asteraceae*: new insights from studies of *Senecio squalidus* (Oxford ragwort). Annals of Botany 108, 687-698.

Alves, L.M., 1975. The gibberellin and the gibberellin-like substances of *Stevia rebaudiana* bertoni. University of Chicago.

Alves, L.M., Ruddat, M., 1979. Presence of gibberellin-A20 in *stevia-rebaudiana* and its significance for the biological-activity of steviol. Plant and Cell Physiology 20, 123-130.

Andolfi, L., Ceccarini, L., Macchia, M., 2002. Caratteristiche bioagronomiche di *Stevia rebaudiana*. L'Informatore Agrario 23, 5.

Andolfi, L., Macchia, M., Ceccarini, L., 2006. Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. Italian Journal of Agronomy 1, 257-262.

Angelini, L.G., Tavarini, S., 2014. Crop Productivity, Steviol Glycoside Yield, Nutrient Concentration and Uptake of *Stevia rebaudiana* Bert. under Mediterranean Field Conditions. Communications in Soil Science and Plant Analysis 45, 2577-2592.

Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55, 373-399.

B

Baly, E., 1935. The kinetics of photosynthesis. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 117, 218-239.

Banerjee, A., Sharkey, T.D., 2014. Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. Natural Product Reports 31, 1043-1055.

Banerjee, M., Sarkar, P., 2008. *In vitro* callusing in *Stevia rebaudiana* Bertoni using *cyanobacterial* media-a novel approach to tissue culture. International Journal of Integrative Biology 3, 163-168.

Basuki, Sumaryono, 1990. Effects of black plastic mulch and plant density on the growth of weeds and stevia. BIOTROP special publication, pp. 107-113.

Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defense-mechanisms. New Phytologist 127, 617-633.

Bian, Y.M., 1981. Studies on *Stevia rebaudiana* - a new sweet-tasting plant: refining stevioside and determination of its concentration. Plant Physiology Communications 3, 15-17.

Bondarev, N.I., Sukhanova, M.A., Reshetnyak, O.V., Nosov, A.M., 2003. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. Biologia Plantarum 47, 261-264.

Brandle, J., 1999. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. Canadian Journal of Plant Science 79, 85-92.

Brandle, J., 2001. Stevia rebaudiana with altered steviol glycoside composition. Brevet n° US 625557 B1

Brandle, J., Richman, A., 2011. Understanding the biosynthesis of steviol glycosides, a convergence of genomics and biochemistry. In: Geuns, J.M.C. (Ed.), Proceedings of the 5th *Stevia* symposium, organised by EUSTAS 2011 - *Stevia*: Break-through in Europe., KULeuven, Belgium, pp. 5-14.

Brandle, J.E., Richman, A., Swanson, A.K., Chapman, B.P., 2002. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. Plant Molecular Biology 50, 613-622.

Brandle, J.E., Rosa, N., 1992. Heritability for yield, leaf-stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. Canadian Journal of Plant Science 72, 1263-1266.

Brandle, J.E., Starratt, A.N., Gijzen, M., 1998. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Canadian Journal of Plant Science 78, 527-536.

Brandle, J.E., Telmer, P.G., 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry 68, 1855-1863.

Bridel, M., Lavieille, R., 1931. Le principe à saveur sucrée du Kaà-hê-é (St*evia rebaudiana)* Bertoni. Bulletin de la Société Chimique et Biologique 13, 636-655.

Bryant, J.P., Chapin III, F.S., Klein, D.R., 1983. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. Oikos 40, 357-368.

C

Capewell, S., Buchan, I., 2012. Why have sustained increases in obesity and type 2 diabetes not offset declines in cardiovascular mortality over recent decades in Western countries? Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases 22, 307-311.

Carneiro, J.W.P., 1990. *Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni.* Produção de sementes. Universidade Estadual de Maringa, Maringa, Brésil, 65 p.

Carneiro, J.W.P., 2007. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Stages of plant development. Canadian Journal of Plant Science 87, 861-865.

Carneiro, J.W.P., Guedes, T.A., 1992. Influência do contato das sementes de stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) no substrato, avaliada pela funçao de weibull. Revista Brasileira de Sementes 14, 65-68.

Carneiro, J.W.P., Martins, E.N., Guedes, T.A., Dasilva, M., 1992. The performance of stevia crops transplanted in different densities and double spacing. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 27, 1273-1282.

Carneiro, J.W.P., Muniz, A.S., Guedes, T.A., 1997. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. Canadian Journal of Plant Science 77, 473-474.

Ceunen, S., Geuns, J.M., 2013a. Steviol glycosides: chemical diversity, metabolism, and function. Journal of natural products 76, 1201-1228.

Ceunen, S., Geuns, J.M.C., 2013b. Glucose, sucrose, and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. Biologia Plantarum 57, 390-394.

Ceunen, S., Geuns, J.M.C., 2013c. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Plant Science 198, 72-82.

Ceunen, S., Geuns, J.M.C., 2013d. Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. Phytochemistry 89, 32-38.

Ceunen, S., 2010. Metabolism of steviol glycosides in *Stevia* species. Th., University of Leuven, Belgium.

Ceunen, S., Werbrouck, S., Geuns, J.M.C., 2011. Accumulation pattern of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni and its simulation by red-light. In: Geuns, J.M.C. (Ed.), Proceedings of the 5th *Stevia* symposium, organised by EUSTAS 2011 - Stevia: Breack-Through in Europe, Heverlee, pp. 41-74.

Ceunen, S., Werbrouck, S., Geuns, J.M.C., 2012. Stimulation of steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* by red LED light. Journal of plant physiology 169, 749-752.

Chang, K.F., Howard, R.J., Gaudiel, R.G., Hwang, S.F., 1997. First report of stevia as a host of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease 81, 311-311.

Chaturvedula, V.S.P., Clos, J.F., Rhea, J., Milanowski, D., Mocek, U., DuBois, G.E., Prakash, I., 2011a. Minor diterpenoid glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry Letters 4, 209-212.

Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I., 2011a. Additional Minor Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*. Natural Product Communications 6, 1059-1062.

Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I., 2011b. Diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. Journal of Medicinal Plants Research 5, 4838-4842.

Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I., 2011c. Structures of the novel diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. Carbohydrate Research 346, 1057-1060.

Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I., 2011d. Utilization of RP-HPLC fingerprinting analysis for the identification of diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. International Journal of Research in phytochemistry & Pharmacology 1, 88-92.

Chaturvedula, V.S.P., Rhea, J., Milanowski, D., Mocek, U., Prakash, I., 2011b. Two Minor Diterpene Glycosides from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. Natural Product Communications 6, 175-178.

Chaturvedula, V.S.P., Upreti, M., Prakash, I., 2011c. Structures of the novel alpha-glucosyl linked diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. Carbohydrate research 346, 2034-2038.

Chen, S., Shu, S., Chen, S.P., Shu, S.Z., 1995. Study on storage technique of *Stevia rebaudiana* seed. Acta Agronomica Sinica 21, 102-105.

Cherrett, J., 1972. Chemical aspects of plant attack by leaf-cutting ants. In: Harbone JB, ed. Phytochemical ecology. Academic Press, London, 13-24.

Coley, P.D., Bryant, J.P., Chapin III, F.S., 1985. Resource availability and plant antiherbivore defense. Science(Washington) 230, 895-899.

Cordoba, E., Porta, H., Arroyo, A., San Román, C., Medina, L., Rodríguez-Concepción, M., León, P., 2011. Functional characterization of the three genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in maize. Journal of experimental botany 62, 2023-2038.

Cordoba, E., Salmi, M., Leon, P., 2009. Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. Journal of Experimental Botany 60, 2933-2943.

Cornara, L., Bononi, M., Tateo, E., Serrato-Valenti, G., Mariotti, M.G., 2001. Trichomes on vegetative and reproductive organs of *Stevia rebaudiana* (*Asteraceae*). Structure and secretory products. Plant Biosystems 135, 25-37.

Cronin, G., Hay, M.E., 1996. Effects of light and nutrient availability on the growth, secondary chemistry, and resistance to herbivory of two brown seaweeds. Oikos 77, 93-106.

Cushman, J.C., 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. American Zoologist 41, 758-769.

D

De Guzman, R., 2010. Autoecological role of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Th., Faculty of Sciences, Engineering and Health, CQUniversity Australia.

De Klerk, G.J., Van der Krieken, W., De Jong, J.C., 1999. Review - The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 35, 189-199.

de Lima Filho, O., Malavolta, E., 1997. Sintomas de desordens nutricionais em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Scientia Agricola 54, 53-61.

Dicke, M., 1994. Local and systemic production of volatile herbivore-induced terpenoids – Their role in plant-carnivore mutualism. Journal of Plant Physiology 143, 465-472.

Dondey, J.-H., 1988. Amélioration de la qualité des plants d'Eucalyptus. Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, Toulouse, 137 p.

Dubois, G.E., Stephenson, R.A., 1985. Diterpenoids sweeteners – Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogs with improved organoleptic properties. Journal of Medicinal Chemistry 28, 93-98.

Dwivedi, R.S., 1999. Unnurtured and untapped super sweet nonsaccharіferous plant species in India. Current Science 76, 1454-1461.

E-F

EFSA, 2013. Dossier Aspartame. Autorité européenne de sécurité des aliments. http://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/aspartame.htm

Espitia C, M., Montoya B, R., Atencio S, L., 2009. Yield of *Stevia rebaudiana* Bert. under three population arrangement in Middle Sinu. Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgacion Cientifica 12, 151-161.

Ferrer, M.M., Good-Avila, S.V., 2007. Macrophylogenetic analyses of the gain and loss of self-incompatibility in the *Asteraceae*. New Phytologist 173, 401-414.

Firn, R.D., Jones, C.G., 2000. The evolution of secondary metabolism - a unifying model. Molecular Microbiology 37, 989-994.

Firn, R.D., Jones, C.G., 2003. Natural products - a simple model to explain chemical diversity. Natural Product Reports 20, 382-391.

Fronza, D., Folegatti, M.V., 2002. Determination of water requirement of *Stevia rebaudiana* using capillary ascension microlysimeter. Food production, poverty alleviation and environmental challenges as influenced by limited water resources and population growth. Volume 1A. 18th International Congress on Irrigation and Drainage, Montreal, Canada, 2002, pp. 1-7.

Fuente, A., 2001. Survey of pests and diseases of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Rev. Ciênc. Tecnol. Dir. Invest. UNA 1, 29-33.

G

Gallais, A., 1989. Théorie de la sélection en amélioration des plantes.

Gardana, C., Scaglianti, M., Simonetti, P., 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1217, 1463-1470.

Gaurav, S.S., Singh, Y.P., Sirohi, S.P.S., 2008. Genetic variability for yield and quality traits in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Progressive Research 3, 95-96.

Gayler, S., Priesack, E., 2007. PLATHO - a dynamic plant growth model considering competition between individuals and allocation to carbon-based secondary compounds. Pma 2006: Second International Symposium on Plant Growth Modeling, Simulation, Visualization and Applications, Proceedings, 85-92.

Geuns, J., Struyf, T., 2010. Radical scavenging activity of steviol glycosides and steviol glucuronide. In Stevia: science, no fiction. Proceedings of the 4th EUSTAS Stevia Symposium, J.M.C. Geuns (Ed), Euprint, Heverlee, pp 191-207.

Geuns, J.M.C., 2003. Stevioside. Phytochemistry 64, 913-921.

Geuns, J.M.C., 2010. Stevia and steviol glycosides. J.M.C. Geuns (Ed), Euprint, Heverlee, Belgium.

Gibon, Y., Pyl, E.-T., Sulpice, R., Lunn, J.E., Hoehne, M., Guenther, M., Stitt, M., 2009. Adjustment of growth, starch turnover, protein content and central metabolism to a decrease of the carbon supply when Arabidopsis is grown in very short photoperiods. Plant Cell and Environment 32, 859-874.

GNIS, 2003. Le tournesol : schémas de sélection. Centre de ressources sur les semences et les espèces végétales. http://www.gnis-pedagogie.org/pages/tournesol/selectiontns/1.4.htm

Goettemoeller, J., Ching, A., 1999. Seed Germination in *Stevia rebaudiana*. In: J. Janick (ed.), Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA, pp. 510-511.

Guehl, J.M., Aussenac, G., Bouachrine, J., Zimmermann, R., Pennes, J.M., Ferhi, A., Grieu, P., 1991. Sensitivity of leaf gas-exchange to atmospheric drought, soil drought, and water-use efficiency in some mediterranean abies species. Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere 21, 1507-1515.

Guleria, P., Kumar, V., Yadav, S.K., 2011. Effect of sucrose on steviol glycoside biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana*. Asian Journal of Plant Sciences 10, 401.

Guleria, P., Masand, S., Yadav, S.K., 2014. Overexpression of SrUGT85C2 from Stevia reduced growth and yield of transgenic Arabidopsis by influencing plastidial MEP pathway. Gene 539, 250-257.

Guleria, P., Yadav, S.K., 2013. Agrobacterium Mediated Transient Gene Silencing (AMTS) in *Stevia rebaudiana*: Insights into Steviol Glycoside Biosynthesis Pathway. Plos One 8(9):e74731.

H

Hajihashemi, S., Geuns, J., 2013. Free radical scavenging activity of steviol glycosides, steviol glucuronide, hydroxytyrosol, metformin, aspirin and leaf extract of *Stevia rebaudiana*. Free Radicals and Antioxidants 3, S34-S41.

Hajihashemi, S., Geuns, J.M.C., Ehsanpour, A.A., 2013. Gene transcription of steviol glycoside biosynthesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni under polyethylene glycol, paclobutrazol and gibberellic acid treatments in vitro. Acta Physiologiae Plantarum 35, 2009-2014.

Hale, B.K., Herms, D.A., Hansen, R.C., Clausen, T.P., Arnold, D., 2005. Effects of drought stress and nutrient availability on dry matter allocation, phenolic glycosides, and rapid induced resistance of poplar to two lymantriid defoliators. Journal of chemical ecology 31, 2601-2620.

Haukioja, E., Ossipov, V., Koricheva, J., Honkanen, T., Larsson, S., Lempa, K., 1998. Biosynthetic origin of carbon-based secondary compounds: cause of variable responses of woody plants to fertilization? Chemoecology 8, 133-139.

Hearn, L.K., Subedi, P.P., 2009. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. Journal of Food Composition and Analysis 22, 165-168.

Helliwell, C.A., Sullivan, J.A., Mould, R.M., Gray, J.C., Peacock, W.J., Dennis, E.S., 2001. A plastid envelope location of Arabidopsis ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. Plant Journal 28, 201-208.

Hemmerlin, A., 2013. Post-translational events and modifications regulating plant enzymes involved in isoprenoid precursor biosynthesis. Plant Science 203, 41-54.

Herms, D.A., Mattson, W.J., 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. Quarterly Review of Biology 67, 283-335.

Huang, Y.S., Guo, A.G., Qian, Y., Chen, L.Y., Gu, H.F., 1995. Studies on the variation of steviosides content and selection of type R-A in *Stevia rebaudiana*. Journal of Plant Resources & Environment 4, 28-32.

Humphrey, T.V., Richman, A.S., Menassa, R., Brandle, J.E., 2006. Spatial organisation of four enzymes from *Stevia rebaudiana* that are involved in steviol glycoside synthesis. Plant Molecular Biology 61, 47-62.

I-J

Ibrahim, M.H., Jaafar, H.Z., Rahmat, A., Rahman, Z.A., 2011. Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kacip fatimah (*Labisia Pumila* Blume). International journal of molecular sciences 12, 5238-5254.

Il-Suk, K., Mira, Y., Ok-Hwan, L., Suk-Nam, K., 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. LWT -- Food Science and Technology 44, 1328-1332.

Ishiba, C., Yokoyama, T., Tani, T., 1982. Black Spot Disease of Stevia Caused by *Alternaria steviae*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 48, 44-51.

Izquierdo, A.M., Torres, M.d.P.N., Jiménez, G.S., Sosa, F.C., 2011. Changes in biomass allocation and phenolic compounds accumulation due to the effect of light and nitrate supply in *Cecropia peltata* plants. Acta Physiologiae Plantarum 33, 2135-2147.

Jain, P., Kachhwaha, S., Kothari, S.L., 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. Scientia Horticulturae 119, 315-319.

Joint FAO/WHO Expert Comittee on Food Additives, 2010. Steviol glycosides. Compendium of Food Additive Specifications, 73th meeting, FAO JECFA Monographs 10. FAO, Rome, pp. 17-22.

Jones, M.M., Osmond, C.B., Turner, N.C., 1980. Accumulation of solutes in leaves of sroghum and sunflower in response to water deficits. Australian Journal of Plant Physiology 7, 193-205.

Jones, P., Vogt, T., 2001. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. Planta 213, 164-174.

Jooken, E., Amery, R., Monballiu, A., Boudewijn, M., 2013. Correlation between Structure and Taste of Steviol Glycosides: Some Preliminary Results. In: Geuns, J.M.C. (Ed.), Proceedings of the 7th *Stevia* symposium, organised by EUSTAS 2013 – Knowledge on tour in Europe, Heverlee, pp. 85-93.

K

Kamalakannan, A., Valluvaparidasan, V., Chitra, K., Rajeswari, E., Salaheddin, K., Ladhalakshmi, D., Chandrasekaran, A., 2007. First report of root rot of stevia caused by *Sclerotium rolfsii* in India. Plant Pathology 56, 350-350.

Kawoosa, T., Singh, H., Kumar, A., Sharma, S.K., Devi, K., Dutt, S., Vats, S.K., Sharma, M., Ahuja, P.S., Kumar, S., 2010. Light and temperature regulated terpene biosynthesis: hepatoprotective monoterpene picroside accumulation in *Picrorhiza kurrooa*. Functional & Integrative Genomics 10, 393-404.

Kennelly, E.J., 2002. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Taylor and Francis, London and New York, pp. 68-85.

Kienle, U., 2010. What kind of Stevia would you chose? Cultivation and production - worldwide aspects. Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety 5, 241-250.

Kim, K.K., Sawa, Y., Shibata, H., 1996. Hydroxylation of ent-kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni - Purification and partial characterization of the enzyme. Archives of Biochemistry and Biophysics 332, 223-230.

Kinghorn, A., 2002. Overview. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), Stevia: the Genus *Stevia*. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Taylor and Francis, London, pp. 1-17.

Kinghorn, A.D., Soejarto, D.D., Nanayakkara, N.P.D., Compadre, C.M., Makapugay, H.C., Hovanecbrown, J.M., Medon, P.J., Kamath, S.K., 1984. Potential sweetening agents of plant-origin. A phytochemical screening-procedure for sweet ent-kaurene glycosides in the genus *Stevia*. Journal of Natural Products 47, 439-444.

Kishore, G.M., Motion, M., Hicks, P.M., Hansen, J., Houghton-Larsen, J., Hansen, E.H., Mikkelsen, M.D., Tavares, S., Blom, C., 2011. Production of steviol glycosides in microorganisms. Brevet n° US 20130171328 A1.

Kobayashi, M., Horikawa, S., Dergandi, U., J., and Mitsuhashi, H. 1977. Dulcoside A and B, New diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 16, 1405-1408.

Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K., Tanaka, O., 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 15, 981-983.

Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E., Keinänen, M., 1998. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. Oikos 83, 212-226.

Kumar, H., Kaul, K., Bajpai-Gupta, S., Kaul, V.K., Kumar, S., 2012a. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Gene 492, 276-284.

Kumar, H., Singh, K., Kumar, S., 2012b. 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase from *Stevia rebaudiana* Bertoni is a functional gene. Molecular Biology Reports 39, 10971-10978.

Kumar, H., Kumar, S., 2013. A functional (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase exhibits diurnal regulation of expression in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Gene 527, 332-338.

Kumar, R., Sharma, S., Ramesh, K., Singh, B., 2012. Effects of shade regimes and planting geometry on growth, yield and quality of the natural sweetener plant stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in north-western Himalaya. Archives of Agronomy and Soil Science, 1-17.

Kumar, R., Sharma, S., Prasad, R., 2013. Yield, Nutrient Uptake, and Quality of Stevia as Affected by Organic Sources of Nutrient. Communications in Soil Science and Plant Analysis 44, 3137-3149.

Kumar, R., Sood, S., Sharma, S., Kasana, R.C., Pathania, V.L., Singh, B., Singh, R.D., 2014. Effect of plant spacing and organic mulch on growth, yield and quality of natural sweetener plant Stevia and soil fertility in western Himalayas. International Journal of Plant Production 8, 311-333.

L

Lal, R.K., Chandra, R., Gupta, M.M., Singh, A.K., Manju, S., Verma, R.K., Misra, H.O., Kalra, A., Gupta, A.K., Lal, C., Singh, H.P., Kumar, B., Singh, H.N., Shankar, H., Dhawan, O.P., Krishna, A., Bansal, K., Hena, R., Bansal, R.P., Chauhan, H.S., Singh, S., Zaim, M., Bahl, J.R., Pandey, R., 2011. Registration of a high yielding variety CIMAP Madhu of stevia (*Stevia rebaudiana*). Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences 33, 77-80.

Lambers, H., Chapin, I.F.S., Chapin, F.S., Pons, T.L., 2008. Plant physiological ecology. Springer, New York, USA.

Landázuri, P., Aguirre, D., Amores, F., Vaca, I., 2009. Propagación de *Stevia rebaudiana* Bert. In: P.A.L.J.O.T. (Ed.), *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Sangolquí, Ecuador, pp. 7-10.

Lankes, C., Zabala, U.M., 2011. Evaluation of *Stevia rebaudiana* genotypes. In: Geuns, J.M.C. (Ed.), Proceedings of the 5th *Stevia* symposium, organised by EUSTAS 2011 - Stevia: Break-through in Europe. Euprint, Heverlee, pp. 75-87.

Lavini, A., Riccardi, M., Pulvento, C., De Luca, S., Scamosci, M., d'Andria, R., 2008. Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. Italian Journal of Agronomy 2, 9.

Lee, J.I., Kang, K.H., Ham, Y.S., 1978. The high yielding Stevia variety Suweon 2. Office of Rural Development: Annual research report 21, p. 21.

Lee, J.I., Kang, K.H., Park, H.W., 1982. New high rebaudioside-A stevia variety "Suweon 11". The Research Reports of the Office of Rural Development 24, 186-188.

Lemus-Mondaca, R., Vega-Galvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K., 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry 132, 1121-1132.

Lewis, W.H., 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (*Asteraceae*) leaves as a sweetener in Paraguay. Economic Botany 46, 336-337.

Lima Filho, O.F.d., Malavolta, E., Sena, J.O.A.d., Carneiro, J.W.P., 1997a. Uptake and accumulation of nutrients in stevia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: I. Macronutrients. Scientia Agricola 54, 14-22.

Lima Filho, O.F.d., Malavolta, E., Sena, J.O.A.d., Carneiro, J.W.P., 1997b. Uptake and accumulation of nutrients in stevia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: II. Micronutrients. Scientia Agricola 54, 23-30.

Lobo, F.d.A., de Barros, M., Dalmagro, H., Dalmolin, Â., Pereira, W., de Souza, É., Vourlitis, G., Ortíz, C.R., 2013. Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel—a critical look at the models. Photosynthetica 51, 445-456.

Lokhande, S.D., Ogawa, K., Tanaka, A., Hara, T., 2003. Effect of temperature on ascorbate peroxidase activity and flowering of *Arabidopsis thaliana* ecotypes under different light conditions. Journal of Plant Physiology 160, 57-64.

Lommen, W.J.M., Bouwmeester, H.J., Schenk, E., Verstappen, F.W.A., Elzinga, S., Struik, P.C., 2008. Modelling processes determining and limiting the production of secondary metabolites during crop growth: the example of the antimalarial artemisinin produced in Artemisia annua. Proceedings of the International Symposium on Plants as Food and Medicine: the Utilization and Development of Horticultural Plants for Human Health, 87-94.

M

Macchia, M., Andolfi, L., Ceccarini, L., Angelini, L.G., 2007. Effects of temperature, light and pre-chilling on seed germination of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni accessions. Italian Journal of Agronomy 2, 55-62.

Madhav, H., Bhasker, S., Chinnamma, M., 2013. Functional and structural variation of uridine diphosphate glycosyltransferase (UGT) gene of *Stevia rebaudiana*-UGTSr involved in the synthesis of rebaudioside A. Plant Physiology and Biochemistry 63, 245-253.

Madore, M., 2000. Synthesis and degradation of diterpene glycosides in source leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Plant Biology (Rockville): 129.

Maheshwar, H.M., 2005. Effect of different levels of nitrogen and dates of planting on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Department of horticulture. University of Agricultural Sciences, Dharwad, 66 p.

Mahmoud, S.S., Croteau, R.B., 2001. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 8915-8920.

Maiti, C.K., Sen, S., Acharya, R., Acharya, K., 2007. First report of *Alternaria atternata* causing leaf spot on *Stevia rebaudiana*. Plant Pathology 56, 723-723.

Manish, T., Rema, S., Tadhani, M., Subhash, R., 2006. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. Journal of Medical Sciences (Pakistan) 6, 321-326.

Marti, N., Funes, L.L., Saura, D., Micol, V., 2008. An update on alternative sweeteners. International Sugar Journal 110, 425-429.

Masada, S., Terasaka, K., Mizukami, H., 2007. A single amino acid in the PSPG-box plays an important role in the catalytic function of CaUGT2 (Curcumin glucosyltransferase), a Group D Family 1 glucosyltransferase from *Catharanthus roseus*. Febs Letters 581, 2605-2610.

Massad, T.J., Dyer, L.A., Vega, G., 2012. Costs of Defense and a Test of the Carbon-Nutrient Balance and Growth-Differentiation Balance Hypotheses for Two Co-Occurring Classes of Plant Defense. PloS one 7:e47554.

Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., Sawada, M., Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K., Ishidate, M., Sofuni, T., 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. Mutagenesis 11, 573-579.

McGarvey, B.D., Attygalle, A.B., Starratt, A.N., Xiang, B.S., Schroeder, F.C., Brandle, J.E., Meinwald, J., 2003. New non-glycosidic diterpenes from the leaves of *Stevia rebaudiana*. Journal of Natural Products 66, 1395-1398.

Metivier, J., Viana, A.M., 1979. Effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble-proteins, sugars, and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. Journal of Experimental Botany 30, 1211-1222.

Michalik, A., Hollinshead, J., Jones, L., Fleet, G.W.J., Yu, C.-Y., Hu, X.-G., van Well, R., Horne, G., Wilson, F.X., Kato, A., Jenkinson, S.F., Nash, R.J., 2010. Steviamine, a new indolizidine alkaloid from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry Letters 3, 136-138.

Minne, V.J.Y., Compernolle, F., Toppet, S., Geuns, J.M.C., 2004. Steviol quantification at the picomole level by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 2445-2449.

Mitsuhashi, H., Ueno, J., Sumita, T., 1975. Studies on cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni – Determination of stevioside. Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 95, 127-130.

Miyasaki, T., Harada, K., 2003. Attraction Activity of Mushroom Water Extracts for Aquatic Animals. Journal of National Fisheries University 51, 147-155.

Mizukami, H., Shiba, K., Ohashi, H., 1983. Effect of temperature on growth and stevioside formation of *Stevia rebaudiana*. Shoyakugaku Zasshi 37, 175-179.

Modi, A., Shukla, Y., Litoriya, N., Subhash, N., 2011. Studies of Peroxidase and Esterase Enzyme Activity and Their Isoforms at Different Leaf Stages of *Stevia rebaudiana*. Sugar Tech 13, 99-101.

Mohamed, A.A.A., Ceunen, S., Geuns, J.M.C., Van den Ende, W., De Ley, M., 2011. UDP-dependent glycosyltransferases involved in the biosynthesis of steviol glycosides. Journal of Plant Physiology 168, 1136-1141.

Montes, J.M., Technow, F., Bohlinger, B., Becker, K., 2013. Grain quality determination by means of near infrared spectroscopy in *Jatropha curcas* L. Industrial Crops and Products 43, 301-305.

Moraes, R.M., Donega, M.A., Cantrell, C.L., Mello, S.C., McChesney, J.D., 2013. Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. Industrial Crops and Products 51, 385-389.

Morita, T., 1987. Dried leaves. Brevet japonais n° 62-96025 [English abstract]

Morita, T., Yucheng, B., 1998. Variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Brevet n° US6031157.

Morlock, G.E., Meyer, S., Zimmermann, B.F., Roussel, J.-M., 2014. High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 1350, 102-111.

Müller, V., Lankes, C., Zimmermann, B.F., Noga, G., Hunsche, M., 2013. Centelloside accumulation in leaves of *Centella asiatica* is determined by resource partitioning between primary and secondary metabolism while influenced by supply levels of either nitrogen, phosphorus or potassium. Journal of plant physiology 170, 1165-1175.

N

Nakamura, S., Tamura, Y., 1985. Variation in the main glycosides of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Japanese Journal of Tropical Agriculture 29, 109-115.

Nanayakkara, N.P.D., Klocke, J.A., Compadre, C.M., Hussain, R.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 1987. Potential sweetening agents of plant-origin. Characterization and feeding deterrent effects on the aphid, schizaphis-graminum, of some derivatives of the sweet compounds, setevioside and rebaudioside A. Journal of Natural Products 50, 434-441.

Nevase, P.V., Bafna, A.M., Shinde, K.A., 2009. Effect of N, P, K and fym on yield of stevia. Annals of Plant Physiology 23, 262-263.

O

Ohta, M., Sasa, S., Inoue, S., Tamai, T., Fujita, I., Morita, K., Matsuura, F., 2010. Characterization of novel steviol glucosides from leaves of *Stevia rebaudiana* Morita. Journal of Applied Glycoscience 57, 199-209.

Ohtani, K., Aikawa, Y., Kasai, R., Chou, W.-H., Yamasaki, K., Tanaka, O., 1992. Minor diterpene glycosides from sweet leaves of *Rubus suavissimus*. Phytochemistry 31, 1553-1559.

Oliveira, M.B., Barbosa, S.C., Petrofeza, S., 2013. Comparative in vitro and in planta analyses of extracellular enzymes secreted by the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Genetics and Molecular Research 12, 1796-1807.

OMS, 2010. Principaux faits et chiffres sur l'obésité. Organisation modiale de la Santé. http://www.who.int/features/factfiles/obesity/fr/index.html.

P

Pal, P.K., Prasad, R., Pathania, V., 2013. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of plant physiology 170, 1526-1535.

Pal, P.K., Mahajan, M., Prasad, R., Pathania, V., Singh, B., Ahuja, P.S., 2015. Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial Stevia rebaudiana under sub-temperate conditions. Industrial Crops and Products 65, 556-564.

Patil, N.M., 2010. Biofertilizer effect on growth, protein and carbohydrate content in *Stevia rebaudiana* var Bertoni. Recent Research in Science and Technology 2, 42-44.

Pena-Castro, J.M., 2014. Plant molecular response to submergence stress: lessons from SUB1A gene. Revista Fitotecnia Mexicana 37, 325-337.

Picon, C., Guehl, J.M., Ferhi, A., 1996. Leaf gas exchange and carbon isotope composition responses to drought in a drought-avoiding (*Pinus pinaster*) and a drought-tolerant (*Quercus petraea*) species under present and elevated atmospheric CO2 concentrations. Plant Cell and Environment 19, 182-190.

Pieri, V., Belancic, A., Morales, S., Stuppner, H., 2011. Identification and Quantification of Major Steviol Glycosides in *Stevia rebaudiana* Purified Extracts by (1)H NMR Spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 4378-4384.

Pissard, A., Pierna, J.A.F., Baeten, V., Sinnaeve, G., Lognay, G., Mouteau, A., Dupont, P., Rondia, A., Lateur, M., 2013. Non-destructive measurement of vitamin C, total polyphenol and sugar content in apples using near-infrared spectroscopy. Journal of the Science of Food and Agriculture 93, 238-244.

Preethi, D., Shanmukh Anand, P., Hemadri Reddy, S., Jeevan Kumar, S.P., Josthna, P., Naidu, C.V., 2008. In vitro plant regeneration of *Stevia rebaudiana*. Journal of Tropical Medicinal Plants 9, 71-76.

R

Rajasekaran, T., Giridhar, P., Ravishankar, G.A., 2007. Production of steviosides in ex vitro and in vitro grown *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of the Science of Food and Agriculture 87, 420-424.

Raji Akintunde, A., Mohamad, O., 2011. Influence of genetic variation on morphological diversity in accessions of *Stevia rebaudiana* Bertoni. International Journal of Biology 3, 66-72.

Ramesh, K., Singh, V., Megeji, N.W., 2006. Cultivation of Stevia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni : A comprehensive review. Advances in Agronomy, Vol 89, pp. 137-177.

R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: http://www.R-project.org

Reeleder, R., 1999. Septoria leaf spot of *Stevia rebaudiana* in Canada and methods for screening for resistance. Journal of Phytopathology 147, 605-613.

Richman, A., Swanson, A., Humphrey, T., Chapman, R., McGarvey, B., Pocs, R., Brandle, J., 2005. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. Plant Journal 41, 56-67.

Richman, A.S., Gijzen, M., Starratt, A.N., Yang, Z.Y., Brandle, J.E., 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. Plant Journal 19, 411-421.

Robinson, B.L., 1930. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University. The Gray Herbarium of Harvard University, Cambridge, MA.

Robinson, H., King, R.M., 1977. *Eupatorieae*-systematic review. The Biology and Chemistry of the *Compositae*. Academic Press, New York, pp. 437-485.

Romisch-Margl, W., Schramek, N., Radykewicz, T., Ettenhuber, C., Eylert, E., Huber, C., Romisch-Margl, L., Schwarz, C., Dobner, M., Demmel, N., Winzenhorlein, B., Bacher, A., Eisenreich, W., 2007. (CO2)-C-13 as a universal metabolic tracer in isotopologue perturbation experiments. Phytochemistry 68, 2273-2289.

Ruddat, M., Lang, A., Mosettig, E., 1963. Gibberellin activity of steviol, a plant terpenoid. Naturwissenschaften 50, 23-23.

Ruta, C., De Mastro, G., Fortunato, I.M., Mazzi, V., 1999. Modalità di propagazione e tecniche di coltivazione di *Stevia rebaudiana* Bertoni. 33th Congress SIA Agripolis, Padova, Italy.

S

Sadeak, S.M.I., Bonik, J., Ather-uz-Zaman, Azam, F.M.S., Chowdhury, M.H., Rhamatullah, M., 2009. Effects of Auxins for Morphogenic Response on Varied Explants of *Stevia Rebaudiana* Bertoni, an Alternative Sweeter Plant. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 3, 749-7543.

Sakamoto I., Yamasaki K., Tanaka O., 1977a. Application of ^{13}C NMR Spectroscopy to Chemistry of Natural Glycosides: Rebaudioside-C, a New Sweet Diterpene Glycoside of *Stevia rebaudiana*. Chemical & pharmaceutical bulletin 25, 844-846.

Sakamoto I., Yamasaki K., Tanaka O., 1977b. Application of ^{13}C NMR Spectroscopy to Chemistry of Plant Glycosides: Rebaudiosides-D and-E, New Sweet Diterpene-Glucosides of Stevia rebaudiana BERTONI. Chemical & pharmaceutical bulletin 25, 3437-3439.

Schramek, N., Wang, H.H., Romisch-Margl, W., Keil, B., Radykewicz, T., Winzenhorlein, B., Beerhues, L., Bacher, A., Rohdich, F., Gershenzon, J., Liu, B.Y., Eisenreich, W., 2010. Artemisinin biosynthesis in growing plants of Artemisia annua. A (CO2)-C-13 study. Phytochemistry 71, 179-187.

Schuler, M.A., 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. Critical Reviews in Plant Sciences 15, 235-284.

Schwab, W., 2003. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? Phytochemistry 62, 837-849.

Serfaty, M., Ibdah, M., Fischer, R., Chaimovitsh, D., Saranga, Y., Dudai, N., 2013. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. Industrial Crops and Products 50, 731-736.

Shatnawi, M.A., Shibli, R.A., Abu-Romman, S.M., Al-Mazra'awi, M.S., Al Ajlouni, Z.I., Shatanawi, W.A., Odeh, W.H., 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. Spanish Journal of Agricultural Research 9, 213-220.

Shaw, D., Yazdani, R., Muona, O., 1982. Methods for analyzing data on the relative proportions of monoterpenes in conifers. Silvae Genetica 16, 235–239.

Shibata, H., Sawa, Y., Oka, T., Sonoke, S., Kim, K., Yoshioka, M., 1995. Steviol and steviol-glycoside:glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves - purification and partial characterization. Archives of Biochemistry and Biophysics 321, 390-396.

Shibata, H., Sonoke, S., Ochiai, H., Nishihashi, H., Yamada, M., 1991. Glucosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Physiology 95, 152-156.

Shock, C.C., 1982. Experimental cultivation of Rebaudi's stevia in California. University of California, Davis. Agronomy Progress Report, USA.

Shu, S., 1989. *Stevia rebaudiana* variety trials. Zuowu Pinzhong Ziyuan 1, 17-18.

Shu, S.Z., 1995. A study on good variety selection in *Stevia rebaudiana*. Scientia Agricultura Sinica 28, 37-42.

Shu, S.Z., Wang, W.Z., 1988. Variation in quantitative characters in *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relation to yield. Acta Agronomica Sinica 14, 167-173.

Singh, V.P., Singh, R.K., Jai, P., Singh, A.K., Biradar, S.L., 2011. Effect of spacing and bio fertilizers on yield and quality parameters of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). International Journal of Agricultural Sciences 7, 325-329.

Soejarto, D.D., 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), Stevia: the Genus *Stevia*. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Taylor and Francis, London, pp. 18-39.

Soejarto, D.D., Compadre, C.M., Medon, P.J., Kamath, S.K., Kinghorn, A.D., 1983. Potential sweetening agents of plant-origin. Field search for sweet-tasting stevia species. Economic Botany 37, 71-79.

Sreedhar, R.V., Venkatachalam, L., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M.S., Ravishankar, G.A., 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. Biologia Plantarum 52, 355-360.

Starratt, A.N., Kirby, C.W., Pocs, R., Brandle, J.E., 2002. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 59, 367-370.

Stoyanova, S., Geuns, J., Hideg, E., Van den Ende, W., 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. International Journal of Food Sciences and Nutrition 62, 207-214.

Suhendi, D., 1989. Mass selection of *Stevia rebaudiana* Bertoni M. Menara Perkebunan 56, 93-95.

Sun, T.P., Kamiya, Y., 1994. The arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase-A of gibberellin synthesis. Plant Cell 6, 1509-1518.

Swanson, S.M., Mahady, G.B., Beecher, C.W.W., 1992. Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot and rooted-shoot cultures in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28, 151-157.

T-U

Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H., Tabata, M., 1984a. Clonal propagation of Stevia rebaudiana Bertoni by stem-tip culture. Plant Cell Reports 3, 183-185.

Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H., Tabata, M., 1984b. Comparison of stevia plants grown from seeds, cuttings and stem-tip cultures for growth and sweet diterpene glucosides. Plant Cell Reports 3, 180-182.

Tanaka, O., 1997. Improvement of taste of natural sweeteners. Pure and Applied Chemistry 69, 675-683.

Tanaka, T., Kohda, H., Tanaka, O., Chen, F.H., Chou, W.-H., Leu, J.-L., 1981. Rubusoside (*β*-d-Glucosyl Ester of 13-O-*β*-d-Glucosyl-steviol), a Sweet Principle of Rubus chingii Hu (*Rosaceae)*. Agricultural and Biological Chemistry 45, 2165-2166.

Tateo, F., Mariotti, M., Bononi, M., Lubian, E., Martello, S., Cornara, L., 1998. Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. Italian Journal of Food Science 10, 261-267.

Tavarini, S., Angelini, L.G., 2013. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. Journal of the Science of Food and Agriculture 93, 2121-2129.

Tavarini, S., Guidi, L., Martini, A., Angelini, L., 2015. Nitrogen Affects Growth, Steviol Glycosides, Leaf Gas Exchanges and Chlorophyll Fluorescence in *Stevia rebaudiana* Bert. In: Geuns, J.M.C. (Ed.), Proceedings of the 8th *Stevia* symposium, organised by EUSTAS 2015 - Stevia: Growth in Knowledge and Taste, Heverlee, pp. 27-42.

Totte, N., Charon, L., Rohmer, M., Compernolle, F., Baboeuf, I., Geuns, J.M.C., 2000. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. Tetrahedron Letters 41, 6407-6410.

Tsanava, V.P., Sardzhveladze, G.P., Kharebava, L.G., 1991. Effects of some technological measures on composition of the volatile complex in *Stevia rebaudiana*. Subtropicheskie Kul'Tury 3, 64-70.

Tschoep, H., Gibon, Y., Carillo, P., Armengaud, P., Szecowka, M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., Koehl, K., Stitt, M., 2009. Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in Arabidopsis. Plant Cell and Environment 32, 300-318.

Tuomi, J., Niemelä, P., Haukioja, E., Sirén, S., Neuvonen, S., 1984. Nutrient stress: an explanation for plant anti-herbivore responses to defoliation. Oecologia 61, 208-210.

UE 2011. Règlement (UE) n° 1131/2011 de la commission du 11 novembre 2011 modifiant l'annexe II du règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les glycosides de stéviol. Journal officiel de l'Union Européenne.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, F. 2009. Notice to the U.S. Food and Drug Administration (FDA) that the use of Rebiana (Rebaudioside A) derived from *Stevia rebaudiana*, as a Food Ingredient is Generally Recognized as Safe (GRAS). In: NUTRITION, O. O. P. A. H.-.-C. F. F. S. A. A. (ed.) *GRAS Notice 000282*. Washington, DC 20204: Food and Drug Administration.

V-W

Valio, I.F.M., Rocha, R.F., 1976. Physiological-effects of steviol. Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie 78, 90-94.

Vanidze, M.R., Kalandiya, A.G., Chanukvadze, K.R., 2009. Identification and quantitative determination of the content of diterpene glycosides in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya 4, 155-158.

Vasanthi, K.D., Vasundhara, M., Gowda, M.C., Byanna, C.N., 2011. Effect of spacings and fertilizer levels on leaf yield, quality and nutrient uptake of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Crop Research (Hisar) 41, 103-106.

Venkata Sai Prakash, C., 2011. Isolation and Structure Elucidation of Two New Minor Diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*. Organic Chemistry: Current Research. doi:10.4172/2161-0401.1000102

Ward, J.L., Baker, J.M., Llewellyn, A.M., Hawkins, N.D., Beale, M.H., 2011. Metabolomic analysis of Arabidopsis reveals hemiterpenoid glycosides as products of a nitrate ion-regulated, carbon flux overflow. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 10762-10767.

Williams, D.H., Stone, M.J., Hauck, P.R., Rahman, S.K., 1989. Why are secondary metabolites (natural-products) biosynthesized. Journal of Natural Products 52, 1189-1208.

Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry 64, 3-19.

Woelwer-Rieck, U., 2012. The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60, 886-895.

Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., Wuest, M., 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. European Food Research and Technology 231, 581-588.

Wu, C., Venkataraman, S.K., Nettles, B.J., Jaksch, F., Rodenburg, D.L., Alves, K.M., Ibrahim, M.A., McChesney, J.D., 2012. New glycosides from *Stevia rebaudiana*. Planta Medica 78, 1269-1269.

Y-Z

Yadav, A.K., Rajeev, S.S., Rajeev, 2014. Self-incompatibility evidenced through scanning electron microscopy and pollination behaviour in *Stevia rebaudiana*. Indian Journal of Agricultural Sciences 84, 93-100.

Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S., 2011. A review on the improvement of stevia *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Canadian Journal of Plant Science 91, 1-27.

Yang, Y., Huang, S., Han, Y., Yuan, H., Gu, C., Wang, Z., 2015. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. Plant Physiology and Biochemistry 86, 174-180.

Yang, Y.H., Huang, S.Z., Han, Y.L., Yuan, H.Y., Gu, C.S., Zhao, Y.H., 2014. Base substitution mutations in uridinediphosphate-dependent glycosyltransferase 76G1 gene of *Stevia rebaudiana* causes the low levels of rebaudioside A Mutations in UGT76G1, A key gene of steviol glycosides synthesis. Plant Physiology and Biochemistry 80, 220-225.

Yu, C., Xu, K., Shi, Y., 2011. The spectrum model established for measuring the contents of Rebaudioside A and Stevioside quickly in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. 2010 International Conference on Energy, Environment and Development (Iceed2010) 5, 855-861.

Zaidan, L.B.P., Dietrich, S.M.C., Felippe, G.M., 1980. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Japanese Journal of Crop Science 49, 569-574.

Zara, R.R., Rodriguez, S.A.G., Cedo, M.L.O., 2014. Efficient In Vitro Culture Protocol for Mass Propagation of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in the Philippines. Philippine Agricultural Scientist 97, 340-346.

Zhuzhzhalova, T.P., Znamenskaya, V.V., Kornienko, A.V., Podvigina, O.A., 2004. On Stevia selection. Sakharnaya Svekla, 32-33.

Zimmermann, P., Heinlein, C., Orendi, G., Zentgraf, U., 2006. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Cell and Environment 29, 1049-1060.

Annexes

Intensified Separation of Steviol Glycosides from a Crude Aqueous Extract of *Stevia rebaudiana* Leaves Using Centrifugal Partition Chromatography

Authors

Jane Hubert[1], **Nicolas Borie**[1], **Sébastien Chollet**[1], **Joël Perret**[2], **Claire Barbet-Massin**[3], **Monique Berger**[3], **Jean Daydé**[3], **Jean-Hugues Renault**[1]

Affiliations

[1] Institut de Chimie Moléculaire de Reims, UMR CNRS 7312, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France
[2] Stevia Natura, Riom, France
[3] Laboratoire d'Agro-physiologie, UMR INRA-EI Purpan 1054, EI Purpan, Toulouse, France

Key words

- *Stevia rebaudiana*
- Asteraceae
- steviol glycosides
- natural sweeteners
- centrifugal partition chromatography
- centrifugal partition extraction

Abstract

Aqueous extracts of *Stevia rebaudiana* leaves have been approved since 2008 by the Joint Expert Committee for Food Additives as sugar substitutes in many food and beverages in Western and Far East Asian countries. The compounds responsible for the natural sweetness of *Stevia* leaves include a diversity of diterpenoid glycosides derived from a steviol skeleton. These steviol glycosides also exhibit a low calorific value as well as promising therapeutic applications, particularly for the treatment of sugar metabolism disturbances. In this work, centrifugal partition chromatography is proposed as an efficient technical alternative to purify steviol glycosides from crude aqueous extracts of *Stevia* leaves on a multigram scale. Two different commercial instruments, including an ASCPC250® and a FCPE300® made of columns containing 1890 and 231 twin-cells, respectively, were evaluated and compared. All experiments were performed with a polar biphasic solvent system composed of ethyl acetate, *n*-butanol, and water in a gradient elution mode. When using the 1890 partition cell centrifugal partition chromatography column of 250 mL, 42 mg of stevioside, 68 mg of dulcoside A, and 172 mg of rebaudioside A, three major constituents of the initial extract were obtained from 1 g of the initial mixture at purities of 81%, 83%, and 99%, respectively. The productivity was further improved by intensifying the procedure on the 231 partition cell centrifugal partition chromatography column of 303 mL with the sample mass loading increased up to 5 g, resulting in the recovery of 1.2 g of stevioside, 100 mg of dulcoside A, and 1.1 g of rebaudioside A at purities of 79%, 62%, and 98%, respectively. The structures of the isolated compounds were validated by HPLC-UV, ESI-MS, ^{1}H, and ^{13}C NMR analyses. Altogether, the results demonstrate that the column design (i.e., the partition cell number) is an important aspect to be considered for a larger scale centrifugal partition chromatography isolation of *Stevia*-derived natural sweeteners.

Supporting information available at http://www.thieme-connect.de/products

received October 31, 2014
revised January 30, 2015
accepted February 9, 2015

Bibliography
DOI http://dx.doi.org/10.1055/s-0035-1545840
Published online
Planta Med © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

Correspondence
Dr. Jane Hubert
Institut de Chimie Moléculaire de Reims
Campus Sciences Exactes et Naturelles
Bât. 18
51687 Reims cedex
France
Phone: + 33 3 26 91 83 25
jane.hubert@univ-reims.fr

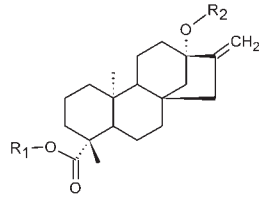
Introduction

Stevia rebaudiana Bertoni (Asteraceae) is a perennial shrub originating in Paraguay and Brazil where it is still known as "stevia" or "honey leaf" [1]. The leaves of this plant have been used for centuries for their natural sweetness. Today, aqueous *Stevia* extracts are approved as sugar substitutes in many Western and Far East Asian food and beverages [2,3]. The compounds responsible for the sweetness of *Stevia* leaves include a diversity of diterpenoid glycosides derived from a steviol skeleton (ent-13-hydroxy-kaur-16-en-19-oic acid). These compounds have been reported to exhibit a sweetness up to 100–300 times higher than glucose [4], and the predominant structures detected in crude *Stevia* extracts are usually stevioside and rebaudioside A (**Fig. 1**).

In addition to their intense sweetness, steviol glycosides have a promising therapeutic value due for instance to their antiviral or hypotensive properties demonstrated *in vitro* [5–9]. Steviol glycosides have also been suggested as a potential alternative for the treatment of diabetes or other disturbances of sugar metabolism, especially through their ability to stimulate insulin secretion in the pancreas [10–12].

Most studies investigating the properties of steviol glycosides have been performed with crude *Stevia* extracts containing steviol glycosides in the form of complex mixtures. Consequently, it

Downloaded by: IP-Proxy Universite-Reims, Université de Reims Champagne-Ardenne. Copyrighted material.



Compound	R1	R2
Steviol	H	H
Steviolbioside	H	β-Glc-β-Glc(2→1)
Stevioside	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2→1)
Rebaudioside A	β-Glc	β-Glc(2→1) β-Glc β-Glc(3→1)
Rebaudioside B	H	β-Glc(2→1) β-Glc β-Glc(3→1)
Rebaudioside C (=dulcoside B)	β-Glc	α-Rha(2→1) β-Glc β-Glc(3→1)
Rebaudioside D	β-Glc-β-Glc(2→1)	β-Glc(2→1) β-Glc β-Glc(3→1)
Rebaudioside E	β-Glc-β-Glc(2→1)	β-Glc-β-Glc(2→1)
Rebaudioside F	β-Glc	β-Xyl(2→1) β-Glc β-Glc(3→1)
Dulcoside A	β-Glc	β-Glc-α-Rha(2→1)

Fig. 1 Chemical structures of the most commonly detected steviol glycosides in *Stevia* leaves.

still remains unclear how each compound varies in the degree of sweetness or whether specific structures among the wide diversity of steviol glycosides are responsible for the above mentioned biological effects. The limiting step arises from the difficulty in separating steviol glycosides from crude extracts with high yield and purity in order to perform sensory analyses or bioassays with individual compounds.

Diverse techniques have been previously reported for the separation and characterization of steviol glycosides from crude *Stevia* extracts, mainly based on column chromatography, thin-layer chromatography, or high-performance liquid chromatography combined to mass spectrometry or nuclear magnetic resonance [13–17]. Most of these methods were developed with an analytical objective either for structure elucidation or for quantification purposes, making them inappropriate to isolate more than a few milligrams of individual compounds.

Because of their structural similarities and adsorption behavior on solid stationary phases, the large-scale production of pure steviol glycosides remains difficult to achieve by conventional preparative separation techniques. An interesting high-speed countercurrent chromatography (HSCCC) method using the biphasic solvent system *n*-hexane/*n*-butanol/water was recently developed to separate individual steviol glycosides from *S. rebaudiana* leaves [18], resulting in the purification of stevioside (54 mg), rebaudioside A (36 mg), and rebaudioside C (13 mg) with purities higher than 97% in a single run. However, the major limitation of this previous study was the long separation duration (420 min) and the sample mass loading, which was limited to 200 mg of crude extract in a 300-mL HSCCC column, making this process limited for a routine application or to perform further bioassays with the generated compounds.

In the present work, centrifugal partition chromatography (CPC) is proposed as an alternative technique to isolate single steviol glycosides on a multigram scale. Like HSCCC, CPC is a solid support-free liquid-liquid chromatographic technique whose principle is based on the partition of compounds between two immiscible liquid phases. The difference is that CPC refers to hydrostatic instruments equipped with a rotor, made of a series of interconnected cells circumferentially engraved on stacked disks in rotation around a single axis. A constant centrifugal acceleration is applied to maintain one liquid phase inside the column while the mobile phase is pumped through the stationary phase [19]. The hydrodynamic equilibrium between the liquid phases depends on the intensity of the centrifugal acceleration, on the flow rate of the mobile phase, and on the physicochemical properties of the biphasic solvent system (density, viscosity, and interfacial tension) [20–23].

All solid support-free liquid-liquid separation techniques including HSCCC and CPC are very interesting in terms of selectivity, sample loading capacity, and scaling-up ability [24,25]. The liquid nature of the stationary phase enables theoretically the recovery of 100% of the injected sample and preserve the chemical integrity of all constituents by avoiding irreversible adsorption phenomena as frequently observed with solid support-based chromatographic techniques. During the past decades, great efforts have been made to develop efficient CCC or CPC methods, mainly for the purification of natural products [26–30].

This paper describes the development of CPC methods to isolate steviol glycosides from a crude industrial *Stevia* extract. Two different commercial instruments (ASCPC250® and FCPE300®) equipped with columns containing 1890 and 231 twin-cells, respectively, were evaluated and compared. The impact of both mass overload and column design on the productivity, together with the issue regarding resolution improvement for such structurally similar structures, are especially discussed.

Results and Discussion

The aim of this work was to develop an efficient liquid-liquid separation method to produce individual steviol glycosides from a crude aqueous extract of *Stevia* leaves with good purity and at high yields. The lack of such method is currently the basic brake in understanding precisely the taste perception of these natural sweeteners. Not only the sensory analysis of pure steviol glycosides but also their *in vitro* and *in vivo* evaluations on specific sugar metabolism disturbance models require at least multiten milligrams of each individual compound. Their separation on a multigram scale would thus be of great value to expand the use of steviol glycosides in the food or pharmaceutical industry after biological and toxicity evaluations.

Steviol glycosides are structurally composed of a diterpenoid skeleton substituted by a number of sugars commonly ranging from one to four, mainly β-glucose and to a lesser extent α-rhamnose or β-xylose (**Fig. 1**). Due to the presence of these sugars, steviol glycosides are highly soluble in water, and it could be ex-

Downloaded by: IP-Proxy Universite-Reims, Université de Reims Champagne-Ardenne. Copyrighted material.

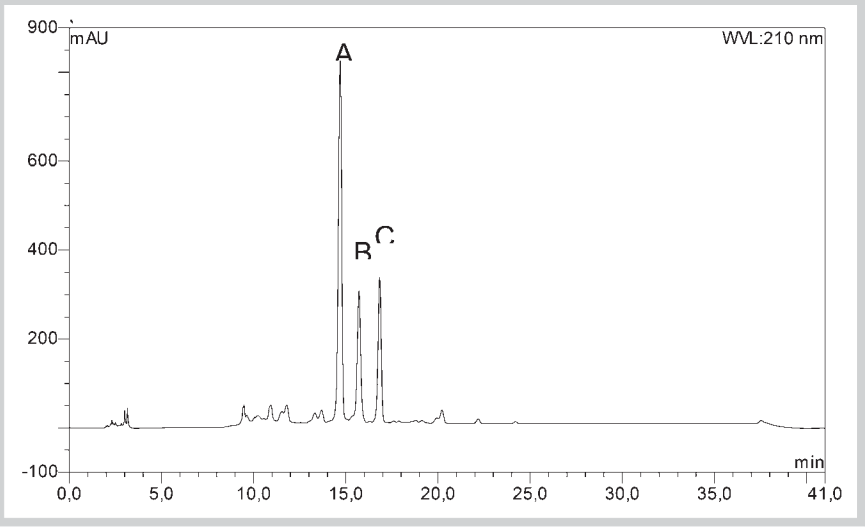


Fig. 2 HPLC chromatogram of the crude aqueous extract of *S. rebaudiana* leaves. **A** Stevioside; **B** dulcoside A; **C** rebaudioside A.

	Experiment A	Experiment B	Experiment C
Equipment	CPC	CPC	CPE
Column capacity (mL)	250	250	303
Rotation speed (rpm)	1200	1200	1000
Flow rate (mL/min)	10	10	20
Sample mass (g)	0.5	1	5
Initial stationary phase retention (%)	75	70	70
Rs (stevioside – dulcoside A)	0.3	0.3	0.2
Rs (stevioside – rebaudioside A)	1.5	1.4	1.3
Rs (dulcoside A – rebaudioside A)	1.5	1.3	1.0
Partition coefficient of stevioside (K_D)	6.3		
Partition coefficient of dulcoside (K_D)	6.8		
Partition coefficient of rebaudioside A (K_D)	8.2		

Rs: resolution

Table 1 Experimental conditions optimized for the purification of steviol glycosides from a crude *Stevia* extract by using centrifugal partition chromatography and centrifugal partition extraction.

pected that their partition into nonpolar organic solvents would be difficult. Several organic/aqueous solvent systems were screened by Huang et al. to evaluate the partition coefficient (K_D) values of three targeted steviol glycosides as a function of solvent system composition [18]. It was shown that solvent systems containing *n*-BuOH and water as major constituents and supplemented by either $CHCl_3$, EtOAc, or *n*-hexane were potentially suitable for steviol glycoside separation. For toxicity reasons, chloroform-based solvent systems were eliminated. Because the predominant compounds of the starting material were substituted by at least three sugars and thus exhibited a high polarity, we also decided to eliminate the use of *n*-hexane and to focus on solvent systems composed of EtOAC, *n*-BuOH, and water. In an attempt to optimize the separation of steviol glycosides on a polarity range as broad as possible with these three solvents, a CPC method was developed in the gradient elution mode. The principle was to progressively increase the polarity of the organic mobile phase in order to selectively transfer the different steviol glycosides from the stationary phase to the mobile phase. Such an approach was successfully used in a recent work to separate a diversity of structurally related sophorolipids from a crude yeast fermentation extract [31].

The CPC method was developed by using an industrial crude aqueous extract of *Stevia* leaves as a model. HPLC analysis of this extract revealed the presence of three predominant compounds detected at the retention times Rt = 12.9 min, Rt = 13.8 min, and Rt = 14.8 min, respectively, together with a diversity of at least seven minor compounds (**Fig. 2**).

Experiments A and B were performed on a CPC column of 250 mL capacity including 1890 partition cells of 0.1 mL and 35% of interconnecting ducts. Due to this quite small partition cell volume, the flow rate was limited to 10 mL/min in order to ensure a good liquid stationary phase retention and avoid a too high pressure inside the column. Experimental parameters are summarized in **Table 1**.

The initial stationary phase retentions were 75% (187.5 mL) and 70% (175 mL) for experiment A and experiment B, respectively. As illustrated by the TLC fractogram of experiment A carried out with a mass sample loading of 500 mg (S1), at least seven different steviol glycosides initially present in the crude aqueous extract of *Stevia* leaves were eluted over the whole fractionation process.

HPLC analyses of these fractions, noted from A to P (S1), enabled the localization of the three major compounds eluting at 12.9 min, 13.8 min, and 14.8 min in fractions F, H, and J, respectively. ^1H and ^{13}C NMR analyses of these fractions led to the unambiguous identification of stevioside, dulcoside A, and rebaudioside A, respectively (**Table 1S**, Supporting Information).

The "HPLC purity" of stevioside, dulcoside A, and rebaudioside A in each fraction was calculated from the HPLC chromatograms as the ratio between the peak area of the compound under examination relative to the sum of all peaks detected at 210 nm. The

Downloaded by: IP-Proxy Universite-Reims, Université de Reims Champagne-Ardenne. Copyrighted material.

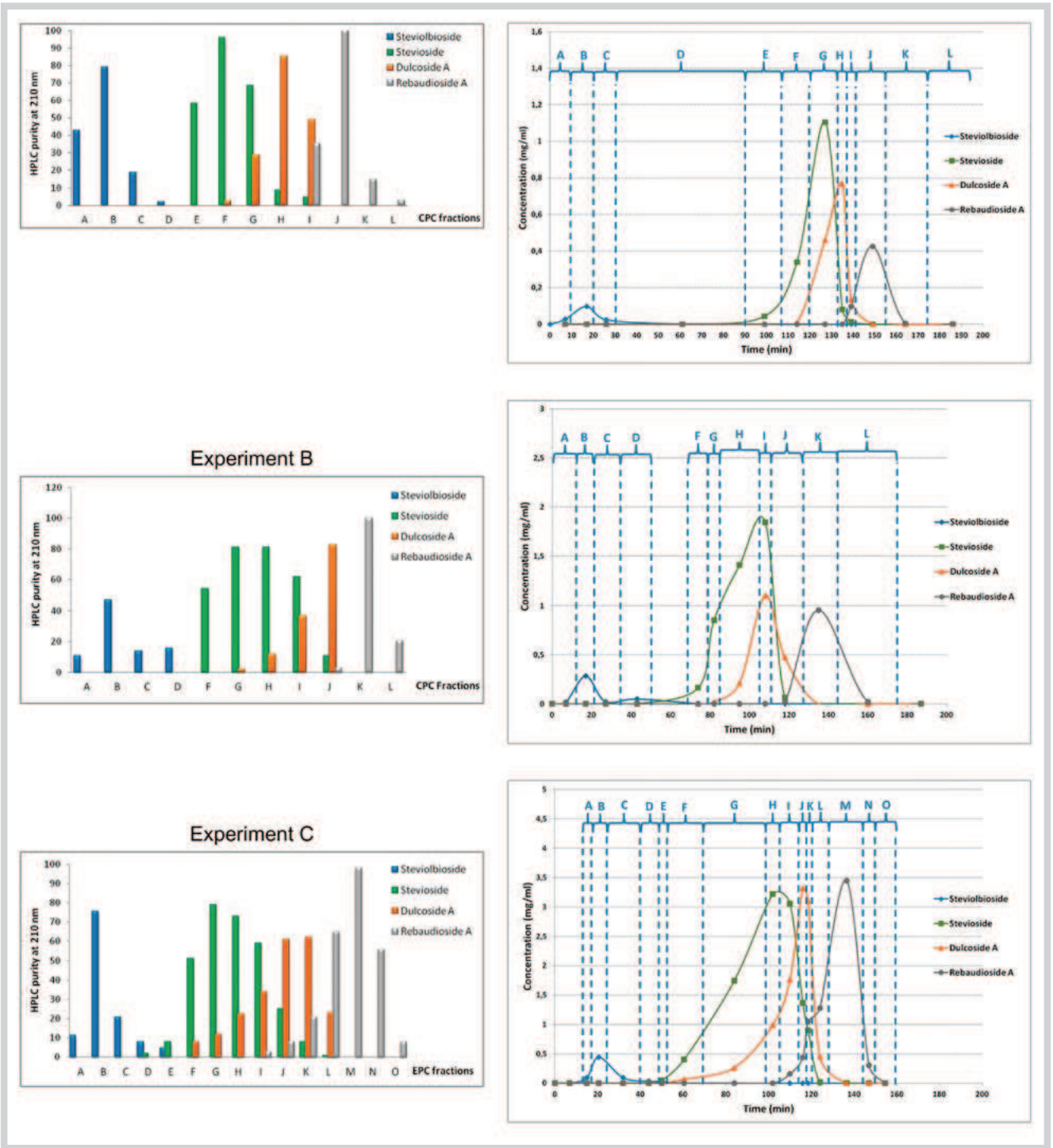


Fig. 3 Purity values and centrifugal partition chromatography elution profile of the major compounds isolated from a crude aqueous extract of *Stevia* leaves using the ASCPC250® instrument (experiment A, 500 mg injected; experiment B, 1 g injected) or the FCPE300® instrument (experiment C, 5 g injected). (Color figure available online only.)

mass of each compound was obtained by directly weighting the corresponding fraction. As a result, we could determine that 43 mg of stevioside, 18 mg of dulcoside A, and 60 mg of rebaudioside A were obtained from experiment A at purities of 96%, 85%, and 99%, respectively. Besides these three major compounds, 7 mg of another minor compound detected by HPLC at a retention time of 8.4 min was recovered with a purity of 79% in fraction B. This compound was identified as steviolbioside by ^{1}H and ^{13}C NMR and comparison with spectroscopic data from the literature [32]. These results are represented by a purity-based fractogram and by a mass-based elution profile (**Fig. 3**).

We must nevertheless emphasize the high difficulty to separate stevioside and dulcoside A by the present method, mainly because of their very close molecular structures only differing by the nature of the third sugar which is an α-rhamnose on dulcoside A instead of a β-glucose in stevioside (**Fig. 1**). Both com-

Downloaded by: IP-Proxy Universite-Reims, Université de Reims Champagne-Ardenne. Copyrighted material.

pounds exhibit similar partition coefficients in the biphasic solvent system (6.3 and 6.8, respectively) and thus very close CPC retention times were observed ($\alpha = 1.08$ and Rs = 0.3).

Besides, rebaudioside A having a molecular skeleton substituted by four sugars exhibited a significantly higher partition coefficient (8.2). This compound was thus well separated from the other three sugar-substituted steviol glycosides. As shown in **Fig. 3**, the separation of dulcoside A and rebaudioside A was nearly total in experiment A with a selectivity and a resolution of $\alpha = 1.2$ and Rs = 1.5, respectively.

In order to increase the recovered quantities of pure steviol glycosides, the same experiment was then performed with a sample mass loading of 1 g instead of 500 mg while maintaining the flow rate and gradient duration identical to experiment A. The HPLC-UV purities of steviolbioside, stevioside, dulcoside A, and rebaudioside A in the collected fractions of experiment B are given in **Fig. 3**. In total, 68 mg of dulcoside A (6.8% of the injected sample) were obtained with a purity of 83% in experiment B instead of 18 mg in experiment A (3.6% of the injected sample). However, only 42 mg of stevioside were obtained in experiment B at a purity of 81% (4.2% of the injected sample) instead of 43 mg in experiment A (8.6% of the injected sample). Finally, only 12 mg of steviolbioside were obtained pure at 47%. The very interesting result from this experiment B was the recovery of 172 mg of rebaudioside A with an HPLC-UV purity of 99% (17.2% of the injected sample) instead of 60 mg from experiment A (12% of the injected sample), indicating that these CPC experimental conditions were highly suitable for the purification of rebaudioside A. The resolution between stevioside and rebaudioside A was indeed not affected by an increase of sample mass (Rs = 1.4 in experiment B as compared to 1.5 in experiment A).

Centrifugal partition extraction is a recently developed solid support-free liquid-liquid separation technique directly evolved from classical CPC devices, but for an equivalent column capacity, the FCPE300® column contains less partition cells of larger volume and interconnected in series by larger ducts. These characteristics make it possible to pump the mobile phase at higher flow rates, to handle higher sample quantities, and thus to enhance the productivity [33, 34]. In this study, the FCPE300® column capacity was 303 mL (instead of 250 mL for the CPC experiments), comprising 231 twin-cells of 1 mL each (instead of 0.1 mL). It was demonstrated previously that the FCPE300® instrument is of great interest for the large-scale purification of ionized compounds when the ion exchange mode is used [33, 35]. The objective here was to investigate if this instrument can also be efficient for the separation of structurally close molecular structures when working in the elution mode. Experiment C was directly performed with a mass sample loading of 5 g at flow rate of 20 mL/min while maintaining the centrifugal force and gradient elution conditions identical to experiments A and B. As the sample mass was increased by a factor of 5, we were expecting a significant increase of productivity, but at the same time, due to the lower number of partition cells in the FCPE300®, we were risking to observe a drastic loss of efficiency directly impacting the resolution and thus the recovery of the steviol glycosides.

The purity profile of the major steviol glycosides in the fractions obtained from experiment C is given in **Fig. 3**. The recovered quantities of stevioside (1.2 g; 24% of injected sample), dulcoside A (100 mg; 2% of injected sample), rebaudioside A (1.1 g; 22% of injected sample), and steviolbioside (82 mg; 1.6% of injected sample) were significantly higher when the sample mass increased from 1 g to 5 g and the partition cell number decreased from 1890 to 231. The separation was also very satisfying regarding the maximum purity of rebaudioside A (98%), but slightly less favorable regarding the purity of stevioside (79%), and significantly less favorable regarding the purity of dulcoside A (62%) and steviolbioside (75%) as compared to ASCPC250® column-based experiments.

As the performance of an industrial separation process is usually evaluated as a compromise between the productivity and the target compound purity, we calculated the productivity values for the different methods as the amount of steviol glycosides isolated per unit of time (h) and per column volume (V_c). Considering the purification of rebaudioside A and remembering that the gradient elution time was 210 min, the productivity of experiment A was 68 mg/h/V_c, that of experiment B was 197 mg/h/V_c, and that of experiment C was 1257 mg/h/V_c, reflecting a significant increase (factor of 6.4) between ASCPC250® (experiment B) and FCPE300® (experiment C). Similarly, the productivity was increased by a factor of 6.4 for steviolbioside, 1.5 for dulcoside A, and 28.6 for stevioside between experiments B and C. However, we should remind that these three compounds were recovered in experiment C with significantly reduced purities (75%, 62% and 79%, respectively). Regarding the separation of stevioside and rebaudioside A, the resolution decreased from 1.4 in experiment B to 1.3 in experiment C, indicating that the gain of column efficiency was not sufficient to compensate the smaller number of partition cells in the CPE column (231 as compared to 1890 in the CPC column). Nevertheless, a resolution of 1.3 largely enabled the well separation of rebaudioside A from stevioside with a high productivity. Regarding the separation of dulcoside A and rebaudioside A, the resolution obtained from experiment C was 1.0.

As the length of a CPC column and the resolution between two analytes are correlated by the following expression:

$$\frac{R_{S1}^2}{n_1} = \frac{R_{S2}^2}{n_2}$$

[36], we could evaluate that a higher number of partition cells in the CPC column of 390 would be required to reach a satisfying resolution of 1.3 between dulcoside A and rebaudioside A. However, in this case, the experiment duration would also be increased, resulting in a slight loss of productivity. Again the compromise to be established between all separation process parameters strongly depends on each industrial strategy. The same calculation could be done for the resolution between stevioside and dulcoside A. A column of about 5000 partition cells would be necessary to reach a resolution of 1.3, what is practically unrealistic. Thus, improving the resolution of these two very close compounds would require the optimization of the biphasic solvent system.

Materials and Methods

Reagents

Chloroform ($CHCl_3$), acetonitrile (ACN), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH), and methanol (MeOH) were purchased from Carlo Erba Reactifs SDS. Deuterated methanol (MeOD-d_4) was purchased from Eurisotop. Deionized water was used to prepare all aqueous solutions. A crude extract of steviol glycosides ("steviol glycosides 80", batch n° STSG-110510-SQ80) was provided by the company Stevia Natura.

Downloaded by: IP-Proxy Universite-Reims, Université de Reims Champagne-Ardenne. Copyrighted material.

Centrifugal partition chromatography instruments

ASCPC250® apparatus: The ASCPC250® apparatus (Armen Instrument) is made of 21 stacked disks engraved circumferentially with 1890 twin-cells. The total column capacity was 250 mL. The rotation speed can be adjusted from 500 to 3000 rpm, creating a maximum centrifugal force field up to 600 *g*. The solvents were pumped by an Armen Pump Light version equipped with a double piston and delivering flow rates up to 50 mL/min with low residual pulsation. The maximum pressure was 150 bars. The sample was introduced into the CPC column by using an Armen injector equipped with a 10 mL sample loop. The system was coupled to an ultraviolet detector (Armen) monitored at 210 nm. Fractions of 20 mL were collected by an LS-5600 collector (Armen). Data were acquired using the Armen Glider CPC control software V2.9.

FCPE300® apparatus: FCPE300® (Rousselet Robatel Kromaton) is equipped with a rotor made of seven circular partition disks containing a total of 231 partition twin-cells. The total column capacity was 303 mL. The rotation speed can be adjusted from 200 to 2000 rpm, creating a centrifugal force field up to 437 g. The mobile phase was pumped either in the ascending or in the descending mode with a low residual pulsation Knauer Preparative Pump 1800® V7115. The system was coupled to a UVD 170S detector (Dionex) equipped with a preparative flow cell (6 µL internal volume, 2 mm path length). Fractions of 20 mL were collected by a Pharmacia Superfrac collector.

Centrifugal partition chromatography separation procedures

Steviol glycosides were separated by CPC using a gradient elution procedure. The ASCPC250® column was filled at 500 rpm with the lower aqueous phase of the biphasic solvent system EtOAc/*n*-BuOH/H_2O (4/5/91, v/v). The rotation speed was then adjusted to 1200 rpm, producing a centrifugal acceleration of around 115 *g* inside the column. The organic phase of the biphasic solvent system EtOAc/*n*-BuOH/H_2O (77/15/8, v/v) was used as the initial mobile phase, and the organic phase of the biphasic solvent system EtOAc/*n*-BuOH/H_2O (67/10/23, v/v) was used as the final mobile phase. The flow rate was maintained at 10 mL/min over the whole experiment. The sample solution was prepared by directly dissolving 500 mg or 1 g (experiments A and B) of the crude extract in a 1/1 (v/v) mixture of initial aqueous and organic phases, respectively. The column was preliminarily equilibrated for 15 min with 100% of the initial mobile phase. Then the sample solution was injected through a sample loop of 10 mL and 20 mL for experiments A and B, respectively. The gradient elution was performed by pumping from 100% of the initial mobile phase to 100% of the final mobile phase in 210 min. Experiment C was performed on the FCPE300® by using exactly the same biphasic solvent systems as for experiments A and B. The FCPE300® column was filled at 500 rpm with the lower aqueous phase of the biphasic solvent system EtOAc/*n*-BuOH/H_2O (4/5/91, v/v). The rotation speed was then adjusted to 1000 rpm, also producing a centrifugal acceleration of around 115 *g*. The column was preliminarily equilibrated for 15 min with 100% of the initial mobile phase. Then the sample solution was injected through a 60-mL sample loop, and the flow rate was maintained at 20 mL/min over the whole experiment. The gradient elution was performed by pumping from 100% of the initial mobile phase to 100% of the final mobile phase in 210 min (experiment C). All experiments were conducted at room temperature (20 ± 2 °C).

Molar diffusivities and distribution coefficient calculations

The molar diffusivities (D_s) of steviol glycosides were calculated as given by Wilke and Chang in the following equation:

$$D_S = 7,4.10^{-8} \times \frac{T \times (x \times M)^{1/2}}{\mu \times V^{0,6}}$$

[37]. The partition coefficient (K_D) of stevioside, dulcoside A and rebaudioside A were calculated using the following equation: $V_R = V_m + K_D \times V_s$, with V_R being the retention volume of the targeted compound, V_m the dead volume of the experiment, and V_s the initial stationary phase retention volume.

TLC, HPLC, and NMR analyses of steviol glycosides

The composition of each collected fraction was checked by TLC on Merck 60 F_{254} silica gel plates (Merck), developed with $CHCl_3$/MeOH/H_2O (30/20/4, v/v), sprayed with a sulfuric acid solution (50% in water), and revealed after heating for 1 min at 105 °C. Fractions were pooled according to their TLC composition similarities. Analytical HPLC analyses were performed on a Summit HPLC system equipped with an Ultimate 3000 pump, an ASI-100 autosampler, and a UVD340S diode array detector monitored at 210 nm (Dionex). After *in vacuo* solvent elimination, about 5 mg of each fraction pool were dissolved in 1 mL H_2O. The chromatographic separation was performed on a Luna RP C18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex) maintained at 25 °C. The injection volume was 20 µL. The mobile phases were composed of acetonitrile (solvent A) and distilled water (solvent B). Solvent A decreased from 97% to 96% in 4 min, then decreased to 84% in 1 min, to 60% in 20 min, to 40% in 1 min, and was maintained for 4 min. Then solvent A recycled back to the initial conditions of 97% in 1 min and remained for 10 min.

An aliquot of each fraction pool was also dissolved in 500 µL MeOD and analyzed by NMR spectroscopy at 298 K on a Bruker Avance AVIII-600 spectrometer equipped with a cryoprobe optimized for ^1H detection and with cooled ^1H, ^{13}C et 2D coils and preamplifiers. ^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired at 600.15 MHz and 150.91 MHz, respectively. Additional HSQC, HMBC, and COSY 2D-NMR spectra were acquired using standard Bruker pulse sequences.

Supporting information

TLC profile of the combined CPC fractions as well as ^1H and ^{13}C NMR spectral characteristics of stevioside, dulcoside A, and rebaudioside A are available as Supporting Information.

Acknowledgements

▼

The authors thank the company Stevia Natura for the plant material.

Conflict of Interest

▼

The authors declare no conflict of interest.

References

1 *Hanson JR, De Oliveira BH.* Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. Nat Prod Rep 1993; 10: 301–309

Downloaded by: IP-Proxy Universite-Reims, Université de Reims Champagne-Ardenne. Copyrighted material.

2 *Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M. Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Can J Plant Sci 1998; 78: 527–536
3 *Herranz-Lopez M, Barrajon-Catalan E, Beltran-Debon R, Joven J, Micol V.* Potential medicinal benefits of high intensity sweetener from *Stevia*. Int Sugar J 2011; 113: 792–797
4 *Lemus-Mondaca R, Vega-Galvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K. Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: a comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chem 2012; 132: 1121–1132
5 *Chatsudthipong V, Muanprasat C.* Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. Pharmacol Ther 2009; 121: 41–54
6 *Brown RJ, Rother KI.* Non-nutritive sweeteners and their role in the gastrointestinal tract. J Clin Endocrinol Metab 2012; 97: 2597–2605
7 *Tirapelli CR, Ambrosio SR, de Oliveira AM, Tostes RC.* Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: a therapeutic promise for the treatment of hypertension. Fitoterapia 2010; 81: 690–702
8 *Kedik SA, Yartsev EI, Stanishevskaya IE.* Antiviral activity of dried extract of *Stevia*. Pharm Chem J 2009; 43: 198–199
9 *Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniguchi K, Nakagomi O, Abe Y, Mori S, Sato N, Okutani K, Shigeta S.* Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. Antiviral Res 2001; 49: 15–24
10 *Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K.* Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. Metabolism 2004; 53: 73–76
11 *Barwal I, Sood A, Sharma M, Singh B, Yadav SC.* Development of stevioside Pluronic-F-68 copolymer based PLA-nanoparticles as an antidiabetic nanomedicine. Colloids Surf B Biointerfaces 2013; 101: 510–516
12 *Mohd-Radzman NH, Ismail WIW, Adam Z, Jaapar SS, Adam A.* Potential Roles of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review. Evid Based Complement Alternat Med 2013; 2013; 718049
13 *Cacciola F, Delmonte P, Jaworska K, Dugo P, Mondello L, Rader JL.* Employing ultra high pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. J Chromatogr A 2011; 1218: 2012–2018
14 *Well C, Frank O, Hofmann T.* Quantitation of sweet steviol glycosides by means of a HILIC-MS/MS-SIDA approach. J Agric Food Chem 2013; 61: 11312–11320
15 *Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A, Wust M.* Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. Eur Food Res Technol 2010; 231: 581–588
16 *Tada A, Takahashi K, Ishizuki K, Sugimoto N, Suematsu T, Arifuku K, Tahara M, Akiyama T, Ito Y, Yamazaki T, Akiyama H, Kawamura Y.* Absolute quantitation of stevioside and rebaudioside A in commercial standards by quantitative NMR. Chem Pharm Bull 2013; 61: 33–38
17 *Gardana C, Scaglianti M, Simonetti P.* Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 2010; 1217: 1463–1470
18 *Huang XY, Fu JF, Di DL.* Preparative isolation and purification of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-speed countercurrent chromatography. Sep Purif Technol 2010; 71: 220–224
19 *Foucault AP.* Theory of centrifugal partition chromatography. In: Foucault AP, editor. Centrifugal partition chromatography; chromatographic science series 1995. New York: Marcel Dekker; 1995: 68, 25–50
20 *Berthod A, Deroux Jean M, Bully M.* Liquid polarity and stationary-phase retention in countercurrent chromatography. In: Conway WD, Petroski RJ, editors. Modern countercurrent chromatography. Washington: American Chemical Society; 1995: 16–34
21 *Berthod A, Maryutina T, Spivakov B, Shpigun O, Sutherland IA.* Countercurrent chromatography in analytical chemistry. Pure Appl Chem 2009; 81: 355–387
22 *Marchal L, Intes O, Foucault A, Legrand J, Nuzillard JM, Renault JH.* Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-*n*-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract. I. Flooding conditions–optimizing the injection step. J Chromatogr A 2003; 1005: 51–62
23 *Marchal L, Foucault AP, Patissier G, Rosant JM, Legrand J.* Chapter 5. Centrifugal partition chromatography: an engineering approach. In: Berthod A, editor. Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase. New York: Elsevier; 2002: 115–157
24 *Berthod A.* Countercurrent chromatography: the support-free liquid stationary phase. New York: Elsevier; 2002
25 *Marchal L, Legrand J, Foucault A.* Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. Chem Rec 2003; 3: 133–143
26 *Sticher O.* Natural product isolation. Nat Prod Rep 2008; 25: 517–554
27 *Hostettmann K, Marston A, Hostettmann M.* Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation. Berlin, Heidelberg: Springer Science & Business Media; 1998
28 *Marston A, Hostettmann K.* Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. J Chromatogr A 2006; 1112: 181–194
29 *Pauli GF, Pro SM, Friesen JB.* Countercurrent separation of natural products. J Nat Prod 2008; 71: 1489–1508
30 *Hubert J, Ple K, Hamzaoui M, Renault JH.* Polyphenol purification by solid support-free liquid–liquid chromatography (CCC, CPC). In: Ramawat KG, Mérillon JM, editors. Natural products. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2013: 2145–2172
31 *Kotland A, Hadef I, Renault JH, Hamzaoui M, Martinez A, Borie N, Guilleret A, Reynaud R, Hubert J.* Gradient elution method in centrifugal partition chromatography for the separation of a complex sophorolipid mixture obtained from *Candida bombicola* yeasts. J Sep Sci 2013; 36: 1362–1369
32 *Chaturvedula V, Upreti M, Prakash I.* Structures of the novel α-glucosyl linked diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. Carbohydr Res 2011; 346: 2034–2038
33 *Hamzaoui M, Hubert J, Reynaud R, Marchal L, Foucault A, Renault JH.* Strong ion exchange in centrifugal partition extraction (SIX-CPE): Effect of partition cell design and dimensions on purification process efficiency. J Chromatogr A 2012; 1247: 18–25
34 *Hamzaoui M, Renault JH, Reynaud R, Hubert J.* Centrifugal partition extraction in the pH-zone refining displacement mode: an efficient strategy for the screening and isolation of bioactive phenolic compounds. J Chromatogr B 2013; 937: 7–12
35 *Hamzaoui M, Hubert J, Hadj-Salem J, Richard B, Harakat D, Marchal L, Foucault A, Lavaud C, Renault JH.* Intensified extraction of ionized natural products by ion pair centrifugal partition extraction. J Chromatogr A 2011; 1218: 5254–5262
36 *Du QZ, Ke CQ, Ito Y.* Separation of epigallocatechin gallate and gallocatechin using multiple instruments connected in series. J Liq Chromatogr Rel Technol 1998; 21: 203–208
37 *Wilke CR, Chang P.* Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. AIChE J 1955; 1: 264–270

Downloaded by: IP-Proxy Universite-Reims, Université de Reims Champagne-Ardenne. Copyrighted material.