

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de
l'Environnement

THESE

pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de l'Université de Lille 1

Ingénierie des Fonctions Biologiques

Contribution à la caractérisation du métabolisme
des acides chlorogéniques chez la chicorée :
approches biochimique et moléculaire

par Guillaume Legrand

soutenue le 18 septembre 2015 devant la commission d'examen :

Alain Hehn, *Professeur, Université de Lorraine*

Rapporteur

Benoît St-Pierre, *Professeur, Université de Tours*

Rapporteur

Eric Gontier, *Professeur, Université de Picardie*

Examineur

Philippe Huguenev, *Directeur de recherche, INRA Colmar*

Examineur

Jean-Louis Hilbert, *Professeur, Université de Lille*

Directeur de thèse

David Gagneul, *Maître de conférences, Université de Lille*

Co-encadrant

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de
l'Environnement

THESE

pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de l'Université de Lille 1

Ingénierie des Fonctions Biologiques

Contribution à la caractérisation du métabolisme
des acides chlorogéniques chez la chicorée :
approches biochimique et moléculaire

par Guillaume Legrand

soutenue le 18 septembre 2015 devant la commission d'examen :

Alain Hehn, *Professeur, Université de Lorraine*

Rapporteur

Benoît St-Pierre, *Professeur, Université de Tours*

Rapporteur

Eric Gontier, *Professeur, Université de Picardie*

Examineur

Philippe Hugueneay, *Directeur de recherche, INRA Colmar*

Examineur

Jean-Louis Hilbert, *Professeur, Université de Lille*

Directeur de thèse

David Gagneul, *Maître de conférences, Université de Lille*

Co-encadrant

Résumé

Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire

La chicorée produit et accumule une panoplie originale d'esters d'acide caféique : les acides caftarique (CTA), chicorique (diCTA), chlorogénique (CQA) et isochlorogénique (diCQA). En plus de leurs multiples rôles physiologiques et écologiques pour la plante, ces composés phénoliques sont dotés de nombreuses propriétés nutritionnelles et thérapeutiques. La valorisation de ces composés nécessite, au préalable, une connaissance approfondie de leur métabolisme. Si la biosynthèse du CQA est bien documentée, celles des autres molécules ne sont que partiellement décrites. L'objectif de ce travail de thèse consistait en la caractérisation de la voie de biosynthèse du CQA et du diCQA. L'analyse détaillée des contenus en polyphénols a révélé une distribution tissulaire originale. Le CTA et le diCTA sont les composés majeurs dans les feuilles alors que le diCQA est le composé majeur dans les racines. Les contenus en CQA ne permettent pas de différencier ces organes. En vue d'une analyse transcriptomique, plusieurs systèmes expérimentaux ont été testés de manière à induire la production et l'accumulation des composés ciblés. Par une approche de génétique inverse, deux gènes codant des HCTs et trois autres gènes des HQTs ont été identifiés et caractérisés. Ces protéines interviennent dans la synthèse du CQA. Une approche de biochimie a permis d'identifier une séquence protéique potentiellement impliquée dans la synthèse de diCQA chez la patate douce. Par homologie de séquence, un gène candidat a été identifié chez la chicorée. Les travaux présentés dans ce mémoire constituent une contribution significative au décryptage des voies de biosynthèse de ces molécules au fort potentiel.

Mots clés : acides hydroxycinnamiques, esters d'acide caféique, BAHD, GDSL, gène candidat

Abstract

Characterization of chlorogenic acids metabolism in chicory: biochemical and molecular approaches

Chicory synthesizes and accumulates an original combination of caffeic acid i.e. caftaric (CTA), chicoric (diCTA), chlorogenic (CQA) and isochlorogenic (diCQA) acids. In addition to their multiple physiological and ecological roles in plants, these compounds have many pharmaceutical and nutritional properties. A complete understanding of their biochemical pathways is required for optimization of their production. If CQA biosynthesis is well documented, the pathways involved in the synthesis of the other molecules are far to be fully understood. The goal of this PhD thesis was to characterize the pathways involved in CQA and diCQA synthesis.

Detailed analysis of phenolic contents revealed an original tissue distribution. CTA and diCTA are mainly accumulated in shoots whereas diCQA was the main compound in roots. CQA is uniformly distributed. To anticipate a transcriptomic analysis, several experimental models have been used in order to modulate the synthesis and the accumulation of the compounds of interest. Through a reverse genetic approach, we identified and characterized 2 genes encoding HCTs and 3 genes encoding HQTs. These proteins are involved in the synthesis of CQA. By a biochemical approach, we identify a peptide sequence putatively involved in diCQA synthesis in sweet potato. An homologous gene has been identified in chicory.

Data reported here contribute to a better understanding of the biosynthesis of these high-value compounds.

Key words: hydroxycinnamic acids, caffeic acid esters, BAHD, GDSL, candidate gene

Remerciements

Merci à mon directeur de thèse, Jean-Louis Hilbert, pour son encadrement et son attention pendant ces années de thèse.

Merci à mon encadrant, David Gagneul, pour son suivi, ses conseils et pour sa grande disponibilité.

Merci aux membres de mon jury de thèse, Benoît St-Pierre, Alain Hehn, Eric Gontier et Philippe Huguenev d'avoir accepté de juger mes travaux.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Nicolas Rouhier, Sébastien Duplessis et François Mesnard, d'avoir pris le temps de me conseiller à travers ces rencontres.

Merci à Dominique Vercagne-Marko pour sa précieuse aide dans mes travaux de purification de l'ICS ainsi que pour sa gentillesse. **Merci** également à Gabrielle Chataigné pour ce qu'elle a pu m'apprendre à ce sujet ainsi que pour sa disponibilité.

Merci à Gunnar Wingsle et son équipe de l'Ulmeå Plant Science Center pour leur aide concernant le séquençage de nos extraits protéiques.

Merci à Sylvain Legrand pour son aide en bioinformatique.

Merci à Caroline Rambaud, Christophe Vuylsteker, Philippe Hance et Thierry Cadalen de notre équipe MSSA pour tout ce qu'ils ont pu m'apporter et apporter à ce travail.

Merci à l'ensemble des personnes de l'ex-SADV, pour leur attention et pour les moments partagés en salle de pause.

Merci à l'équipe des serristes pour l'entretien de mes quelques plantes.

Un grand **merci** à Monika Mörchen ! Ce fut une joie de travailler avec toi et toujours un plaisir de te retrouver pour des pauses déjeuner, pique-niques. Que de riches discussions !

Merci à toutes les personnes passées par le bureau des diplomitifs pour cette bonne ambiance ! Une bonne ambiance continue qui a été une aide ô combien précieuse : les discussions (parfois longues certes...), les gâteaux, les débats, la belote,...

Et particulièrement :

Merci Honorine ! Que de chouettes moments entre rires, papotages et travail bien sûr ! J'avoue je suis bavard ! Mais tu n'es pas mieux ! ;-)

Merci Marianne ! La relève est assurée ! Merci pour ton aide sans faille en cette fin de thèse, nos (très nombreux) débats sur bien des sujets. Une chose m'inquiète quand même pour la suite : qui va prendre le relais des « Souris, Jésus t'aime » ?

(Toi aussi tu es bavarde quand même !)

Merci Pauline pour ta sympathie et tes gâteaux.

Merci Matthieu pour ton attention, ton côté décalé (ok, tu vas dire que c'est moi le décalé mais peu importe !) et les débats là aussi.

Merci Nadim pour ton extrême gentillesse, ton souci de l'autre, ta fidélité, ton humour...

Merci Chahinez pour ton travail et ta joie.

Merci Sana, Rihem, Adeline, Mathieu, Ildephonse, Malika, Eva, Jennifer, Max, Julien, Christophe.

Enfin, **MERCI** à toutes les personnes qui m'ont soutenu pendant ces années :

Mes chers frères et sœurs de la communauté de l'Emmanuel et particulièrement pour mes frères et sœurs de maisonnée. Quelle force !

Les membres de l'école de charité et de mission, un soutien de poids pour cette dernière année ! Que de belles choses vécues ensemble ! Et, cela a été une joie d'y être en service !

Mes amis brancardiens et hospitalières de l'hospitalité de Lille à Lourdes et les malades, en particulier Geneviève et Marc.

Mes chers colocs : Arnaud, Emmanuel, František, Mathieu et Vianney pour ces années EXCEPTIONNELLES ! Il n'y a pas eu une seule journée sans être simplement heureux de vous retrouver après le travail ! Et cela a été important pour la thèse.

Mes amis de longue date : Céline et Florence, les inhpiens (Morgane (Bon courage pour ta thèse ! C'est bientôt fini !), Laure, Solenn, Mathilde, Pauline et William, Claire et Marc-Henry, Géraldine et Maxime, Manon et Bastien, Mathilde), les pictaviens (Polo, Charlotto et Christou).

Tous les amis lillois, je n'ose pas m'aventurer à lister... Merci à vous !! Si, quand même, une spéciale dédicace à ma chère filleule Chloé ! Les pauses déjeuner et apéros à l'hôpital pendant une bonne partie de l'année 2014 ont été une grande aide dans des moments durs de la thèse. De même, une dédicace à Charlotte, ma co-équipière de l'apéro, co-fondatrice du GP-AA, membre de l'équipe d'urgence SOS topo, co-adoratrice du saint café et j'en passe ! Merci !

Et pour tous les bons moments encore à venir...

Ma famille, quelle famille formidable ! Cela a été une chance d'être près de vous durant ces années de thèse ! Je pense à mes grands-mères, leur présence est tellement importante ! Un moment difficile, un coup de fil ou une visite et tout est réglé ! Et mes chers grands-pères que j'ai bien sollicités là-haut. Merci !

Mes oncles et tantes, cousins et cousines.

Mes parents, mes frères : vos valeurs, votre soutien, la joie d'être ensemble. Merci pour tout !

*« La nature n'est rien d'autre que la connaissance d'un certain art. »
Laudato Si' - François*

Abréviations

4Cl : 4-coumarate : CoA ligase

5-CQA : acide 5-*O*-caféoylquinique / acide néochlorogénique

AAT : alcool acyltransférase

AmonoCQ : acides caféoylquiniques

ACS : American Chemical Society

ACT : agmatine *N*-hydroxycinnamoyltransférase

AdiCQ : acides dicaféoylquiniques

ADN : acide désoxyribonucléique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

ALCA : American Leather Chemists Association

AMP : adénosine monophosphate

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

AS : anthranilate synthase

AtriCQ : acides tricaféoylquiniques

BEH : ethylene bridged hybrid

BSA : albumine de sérum bovin

C3H : *p*-coumaroyl ester 3-hydroxylase

C4H : cinnamate 4-hydroxylase

CAL-B : lipase B de *Candida Antarctica*

CAS : chemical abstracts service

CCT : hydroxycinnamoyl-CoA : caféoyl-*meso*-tartrate hydroxycinnamoyltransférase

CGT : chlorogénate : glucarate caféoyltransférase

CHI : chalcone isomérase

CHS : chalcone synthase

CM : chorismate mutase

CMI : carboxyméthyluline

CoA : coenzyme A

COMT : caféate 3-*O*-méthyltransférase

CQA : acide 3-*O*-caféoylquinique / acide chlorogénique

CS : chorismate synthase

CSA : caféoylshikimate

CSE : caféoyl shikimate estérase

CTA : acide caféoyltartrique / acide caftarique

CTT : hydroxycinnamoyl-CoA : *meso*-tartrate hydroxycinnamoyltransférase

DAHPh : 3-déoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate

DEAE : diéthylaminoéthyle

DHD : 3-déhydroquinone déhydratase

DHQS : 3-déhydroquinone synthase

diCQA (ou **3,5-diCQA**) : acide 3,5-dicaféoylquinique / acide isochlorogénique

diCTA : acide dicaféoyltartrique / acide chicorique

dNTP : désoxyribonucléique triphosphate

DO : densité optique

DOXP : 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate

DTT : dithiothréitol

E4P : erythrose-4-P

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

EPSP : 5-énolpyruvylshikimate-3-P

EST : expressed sequence tag

EtOH : éthanol

F5H : férulate 5-hydroxylase

FPLC : fast protein liquid chromatography

FPPS : farnésyl diphosphate synthase

fraction Ex : fraction récupérée en sortie de colonne Sephadex et concentrée

fraction Eo : fraction récupérée en sortie de colonne Sepharose et concentrée

GGPPS : géranylgeranyl diphosphate synthase

GPPS : géranyl diphosphate synthase

HCT : hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinat
hydroxycinnamoyltransférase

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

HQT : hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyltransférase

HTT : hydroxycinnamoyl-CoA : tartrate hydroxycinnamoyltransférase (*Arachis glabrata*)

ICS : isochlorogénate synthase

IEF : isoélectrofocalisation

IPP : isopentényl diphosphate

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

LC-ESI-MS/MS : chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem avec ionisation par électrospray

LDL : lipoprotéine à basse densité

MAT : malonyltransférase

MeJA : méthyljasmonate

MEP : 2-C-méthylérythritol-4-phosphate

milieu MS : milieu Murashige & Skoog

milieu YEB : milieu yeast extract beef extract

PAL : phénylalanine ammonialyase

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PEP : phosphoénolpyruvate

pFp : pentafluorophényl

PLGS : protein lynx global server

PMSF : phénylméthanesulfonylfluoride

PNNS : Programme National Nutrition Santé

POD : peroxydase

PPO : polyphénol oxydase

PVDF : polyfluorure de vinylidène

qPCR : PCR quantitative en temps réel

RNA : acide ribonucléique

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SARL : Société A Responsabilité Limitée

SCT : sinapoylglucose : choline sinapoyltransférase

SDH : shikimate déhydrogénase

SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

SK : shikimate kinase

SM : spectrométrie de masse

STS : stilbène synthase

TAL : tyrosine ammonialyase

TFA : acide trifluoroacétique

Unité G : unité guaïacyle

Unité H : unité hydroxyphényle

Unité S : unité syringyle

USDA : United State Department of
Agriculture

UV : ultraviolet

WT : sauvage

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	33
1. Les végétaux : source inépuisable de produits naturels exploités par l'Homme	35
1.1. Les terpénoïdes	37
1.2. Les alcaloïdes	40
1.3. Les composés phénoliques	43
2. Les composés phénoliques : une ressource naturelle riche et diverse	45
2.1. Nature et diversité des composés phénoliques	47
2.1.1. Les formes simples	47
2.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques	47
2.1.1.2. Les acides hydroxycinnamiques	48
2.1.1.3. Les flavonoïdes	52
2.1.1.4. Les stilbènes	54
2.1.2. Les formes complexes	57
2.1.2.1. Les tanins	57
2.1.2.2. Les lignines	60
2.2. Distribution des composés phénoliques dans la plante	62
2.2.1. Répartition aux échelles tissulaire et cellulaire	62
2.2.1.1. A l'échelle cellulaire	62
2.2.1.2. A l'échelle tissulaire	62
2.2.2. Variations au cours de la vie de la plante	63
2.2.3. Variations intraspécifiques	63
2.3. Rôle des composés phénoliques pour la plante	65
2.3.1. Rôles physiologiques des composés phénoliques	65
2.3.1.1. Impact des composés phénoliques sur la germination	65
2.3.1.2. Importance dans la détoxification des formes actives de l'oxygène	66
2.3.1.3. Rôle de soutien : cas de la lignine	67
2.3.2. Rôle dans les interactions plante-environnement	68
2.3.2.1. Mise en place de symbioses	68
2.3.2.2. Protection contre les agressions de parasites	69
2.3.2.3. Protection de la plante contre les rayonnements ultraviolets	72
2.3.2.4. Atout pour la pollinisation	73
2.4. Utilisation des composés phénoliques par l'Homme et importance économique	74
2.4.1. Qualités sensorielles et nutritionnelles	74
2.4.1.1. L'oxydation alimentaire	74
2.4.1.2. Composés phénoliques et flaveur	77
2.4.1.3. Composés phénoliques, astringence et amertume	78
2.4.2. Santé et bien-être : additifs alimentaires, médicaments et cosmétiques	79
2.4.3. Valorisation du végétal d'ornement	81
3. La chicorée, ressource emblématique du Nord de la France	83

3.1. Description botanique et cycle de développement	83
3.2. Symbole et croyances populaires	85
3.3. Une utilisation ancienne	86
3.4. Utilisations agro-alimentaires	88
3.4.1. Les chicorées de l'espèce <i>Cichorium endivia</i>	88
3.4.2. Les chicorées de l'espèce <i>Cichorium intybus</i>	89
3.4.2.1. Les chicorées à feuilles	89
3.4.2.2. Les chicorées industrielles	91
3.4.3. La chicorée fourragère	95
3.5. Les métabolites spécialisés de la chicorée	96
4. Métabolisme des acides hydroxycinnamiques chez la chicorée	101
4.1. Généralités	101
4.2. La voie de l'acide shikimique	102
4.3. La voie des phénylpropanoïdes	104
4.4. Synthèse des dérivés de l'acide caféique	105
5. Objectifs de la thèse	110

CHAPITRE 1 : CARACTERISATION CHIMIQUE DU MATERIEL VEGETAL ET RECHERCHE DE CONDITIONS MODULATRICES DE L'ACCUMULATION DES COMPOSES PHENOLIQUES CHEZ LA CHICOREE

MATERIEL ET METHODES	115
1. Matériel végétal et conditions de culture	115
1.1. Espèce retenue pour l'étude	115
1.2. Conditions de culture	115
1.2.1. Test de germination	115
1.2.2. Culture de plantes en hydroponie	116
1.2.3. Incubation d'explants foliaires	117
1.2.4. Incubation de plantules sur microplaques	118
1.3. Application de traitements	118
1.3.1. Traitements salins ou osmotiques	118
1.3.2. Enrichissement du milieu en précurseurs potentiels des synthèses des différents composés phénoliques	119
1.3.3. Elicitation des explants foliaires par le méthyljasmonate	119
2. Test de germination : expression des résultats	120
3. Analyse métabolique	121
3.1. Prélèvement et conditionnement du matériel végétal	121
3.2. Extraction des solutés	121
3.3. Détermination quantitative des composés phénoliques	121
3.4. Détermination quantitative de proline par colorimétrie	123
3.5. Expression des résultats	123

RESULTATS	124
1. Caractérisation des contenus en composés phénoliques chez la chicorée	124
1.1. Optimisation de la culture de chicorée en hydroponie	124
1.2. Répartition tissulaire des composés phénoliques	126
1.3. Evolution des teneurs en composés phénoliques au cours du développement des plantes	130
2. Induction de l'accumulation des composés par ajout de précurseurs	137
2.1. Sur disques foliaires	137
2.1.1. Effet de la blessure	137
2.1.2. Ajout de CQA au milieu d'incubation	138
2.1.3. Ajout d'acide tartrique au milieu d'incubation	142
2.2. Sur plantules de chicorée mises en culture sur microplaques	142
2.2.1. Ajout de CQA au milieu d'incubation	144
2.2.2. Ajout d'acide tartrique ou de phénylalanine au milieu d'incubation	146
3. Induction des voies de biosynthèse par le méthyljasmonate (MeJA)	148
4. Halodépendance de l'accumulation des composés phénoliques	151
4.1. Généralités sur le stress salin	151
4.1.1. La dégradation des sols	151
4.1.2. Contraintes physiologiques imposées par la salinité	152
4.1.3. Les réponses des plantes face au stress salin	154
4.2. Halodépendance du métabolisme des composés phénoliques au cours de la germination	155
4.2.1. Effet de la salinité sur la germination des graines	155
4.2.2. Effet de la salinité sur les teneurs en composés phénoliques au cours de la germination	159
4.3. Halodépendance du métabolisme des composés phénoliques dans les jeunes plants	161
4.3.1. Définition des conditions expérimentales	161
4.3.2. Effet du stress salin sur les teneurs en composés phénoliques	163
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	166

**CHAPITRE 2 : CLONAGE ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE CINQ
HYDROXYCINNAMOYLTRANSFERASES IMPLIQUEES DANS LA SYNTHESE DE L'ACIDE
CHLOROGENIQUE CHEZ LA CHICOREE**

INTRODUCTION	173
---------------------	------------

PUBLICATION	176
--------------------	------------

Identification and characterization of five BAHD acyltransferases involved in hydroxycinnamoyl ester metabolism in chicory

Guillaume Legrand, Marianne Delporte, Chahinez Khelifi, Adeline Harant, Christophe Vuylsteker, Monika Mörchen, Philippe Hance, Jean-Louis Hilbert, David Gagneul

RESULTATS COMPLEMENTAIRES	220
----------------------------------	------------

1. Matériel et méthodes	220
1.1. Mesure du pH optimal pour les activités CiHCT1 et CiHQT1	220
1.2. Transformation d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	220
1.2.1. Transformation des <i>Agrobacterium tumefaciens</i> par électroporation	220
1.2.2. Floral dip	221
1.2.3. Sélection des lignées homozygotes simple insertion	221
1.2.4. Analyses génotypiques et expression des gènes	222
1.2.5. Analyses phénotypiques	223
1.3. Agroinfiltration de tabac	224
2. pH réactionnel optimal de CiHCT1 et CiHQT1	225
3. Introduction de CiHCT1 et CiHQT1 dans des systèmes hétérologues	226

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	229
-----------------------------------	------------

CHAPITRE 3 : VERS L'IDENTIFICATION DE L'ENZYME RESPONSABLE DE LA CONVERSION D'ACIDE CHLOROGENIQUE EN ACIDE ISOCHLOROGENIQUE CHEZ LA PATATE DOUCE

INTRODUCTION	233
---------------------	------------

MATERIEL ET METHODES	236
-----------------------------	------------

1. Tests enzymatiques à partir des HCT et HQT recombinantes de chicorée	236
2. Protocole de purification de l'ICS	236
2.1. Matériel végétal	236
2.2. Tests enzymatiques	237
2.3. Détermination quantitative des composés phénoliques	237
2.4. Détermination de la concentration en protéines des extraits	237
2.5. Purification de l'ICS	237

3. Séquençage protéique	238
--------------------------------	------------

RESULTATS	240
------------------	------------

1. Etude de l'implication des HCT/HQT de chicorée dans la synthèse de diCQA	240
--	------------

1.1. Activité caféoyl-CoA : chlorogénate caféoyltransférase	240
1.2. Activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase	241
1.3. Analyse structurale des séquences protéiques	243
2. Validation et mise au point du protocole de purification de l'ICS chez la patate douce	246
2.1. Induction de la synthèse de diCQA	247
2.2. Suivi de l'activité enzymatique	252
2.3. Précipitation au sulfate d'ammonium	254
2.4. Choix du pH réactionnel	257
2.5. Choix de la nature du tampon d'extraction	258
2.6. Etape de séparation sur colonne Sephadex	259
2.6.1. Colonne Sephadex G50 – 22 cm	261
2.6.2. Colonne Sephadex G50 – 92 cm	263
2.7. Séparation par échange d'ions	267
2.8. Bilan du protocole de purification	272
3. Identification sur gel	273
4. Séquençage des protéines	277
5. Etude de la séquence potentielle de l'ICS chez la chicorée	279
5.1. Analyse des séquences	279
5.2. Action du PMSF sur l'ICS	281
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	283
CONCLUSION GENERALE	287
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	295
ANNEXES	319
ANNEXE I : Composition du milieu de culture Murashige & Skoog	321
ANNEXE II : Publication	322

Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in Cichorium intybus

Marianne Delporte, Guillaume Legrand, Jean-Louis Hilbert, David Gagneul

Liste des figures :

Introduction

Figure i.1 : Campagne de communication lancée en 2001 dans le cadre du programme national nutrition santé (PNNS) par l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) (p 35) mangerbouger .fr, site consulté le 1^{er} avril 2015 (logo et affiche de communication).
www.michalletaubry.fr (fruits et légumes)

Figure i.2 : Voie de biosynthèse simplifiée des terpénoïdes (A) et classification des terpénoïdes en fonction du nombre d'unités en C5 (B). (p 38)

Figure i.3 : Les principales classes d'alcaloïdes. La structure de base du cycle ainsi que des exemples représentatifs sont figurés. (p 41)

Figure i.4 : Structure de base des composés phénoliques. (p 43)

Figure i.5 : Frontispice d'une édition de 1644 de l'*Historia Plantarum* (A), statut de Théophraste d'Eresos du jardin botanique de Palerme (B) et logo de l'American Leather Chemists Association (C). (p 45)

www.summagallicana.it (Frontispice de l'*Historia Plantarum*), fr.wikipedia.org (Théophraste d'Eresos), www.leatherchemists.org (logo ALCA)

Figure i.6 : Les formes de base des acides hydroxybenzoïques et quelques dérivés. (p 48)

Figure i.7 : Structures chimiques de base des acides hydroxycinnamiques et enzymes impliquées dans leur synthèse. (p 49)

Figure i.8 : Structures chimiques de quelques formes conjuguées des acides hydroxycinnamiques. (p 50)

Figure i.9 : Exemple d'esters simples et multiples d'acide caféique et d'acide quinique. (p 51)

Figure i.10 : Structures chimiques de la coumarine, de la scopolétine et du resvératrol. (p 51)

Figure i.11 : Structures chimiques des trois classes principales de flavonoïdes (A), représentation des 6 anthocyanidines les plus communes (B) et synthèse des 6 anthocyanidines les plus communes (B). (p 53)

Figure i.12 : Réaction d'acylation de l'isoquercitrine par le butyrate d'éthyle. (p 54)

Figure i.13 : Structures chimiques des (E)- et (Z)-resvératrols (A) et exemples de structures de 5 stilbènes (B). (p 55)

Figure i.14 : Biosynthèse du resvératrol par la stilbène synthase (STS) (p 56)

Figure i.15 : Structures chimiques de l'acide gallique (A), d'un tanin hydrolysable, le pentagalloylglucose (polymère formé d'un glucose et de 5 unités d'acide gallique) (B) et de l'acide ellagique (C). (p 58)

Thèse F. Canon, 2010 - page 36

Figure i.16 : Structures chimiques des monomères de flavonols (A) et exemple de tétramère comportant les deux types de liaisons interflavaniques, de type C-C et de type C-O-C (B). (p 59)

Thèse F. Canon, 2010 - page 37

Figure i.17 : Structures chimiques des principaux monomères constituant la lignine. (p 60)

Figure i.18 : Photographies de la fleur de différentes variétés de *Rosa rugosa* (A) et des variétés 'Treviso' et 'Grumolo' de *Cichorium intybus* (B). (p 64)

www.rhs.org.uk (*R. rugosa* 'Alba'), GAP photos / Rachel Warne (*R. rugosa* 'Rubra'), www.florum.fr (*R. rugosa* 'Thumborgiana')

www.gardenista.com (*C. intybus* 'Grumolo'), www.graines-voltz.com (*C. intybus* 'Treviso'),

Figure i.19 : Les principales espèces réactives de l'oxygène. (p 66)

Figure i.20 : Structure de la paroi des végétaux. (p 68)

Murphy et Mc Carthy, 2005 - page 149

Figure i.21 : Des teneurs accrues en acide chlorogénique améliorent la tolérance de la plante au stress oxydatif (A) et à l'infection bactérienne (B). (p 71)

Niggeweg *et al.*, 2004 - page 750

Figure i.22 : Fleurs de *Pachyptera hymenaea* et de *Lantana camara*. (p 73)

toptropicals.com (*P. hymenaea*), www.jardiner-malin.fr et blog.farmerwarehouse.com (*L. camara*)

Figure i.23 : Les principales étapes du brunissement depuis l'oxydation enzymatique initiale des composés phénoliques jusqu'à la formation des pigments bruns. (p 75)

Photographies : G. Legrand

Figure i.24 : Comparaison du brunissement d'une variété de pomme traditionnelle et d'une variété Arctic. (p 76)

www.arcticapples.com consulté le 11 avril 2015

Figure i.25 : Divers composés phénoliques participant à la saveur de produits végétaux : exemples de la vanille, du piment, du gingembre et du clou de girofle. (p 77)

www.dockdesepices.com (*V. planifolia*), sbaus.free.fr (*C. annuum*), blog.biophyto.fr (*Z. officinale*), www.arcturius.org (*S. aromaticum*)

Figure i.26 : Structure chimique de l'oleuropéine. (p 78)

www.newworldoo.com

Figure i.27 : Planche botanique de *Cichorium intybus* (représentation Carl Lindman) et fleurs de chicorée. (p 83)

www.passeportsante.net (planche botanique), fr.wikipedia.org, commons.wikimedia.org (fleurs de chicorée)

Figure i.28 : Classification des chicorées présentes en Europe et variétés cultivées. (p 84)

Photographie D. Gagneul (inflorescence), www.jacques-briant.fr (chicorée scarole), jmg.redarmor.net (chicorée frisée), cuisine.larousse.fr (chicon), www.gerbeaud.com (chicorée rouge de Vérone), www.leroux.fr (chicorée à racine), www.maltawildplants.com (*Cichorium spinosum*)

Figure i.29 : Cycle de développement des chicorées cultivées. (p 85)

Photographie D. Gagneul (inflorescences), thymcigale.e-monsite.com (rosette de chicorée), www.leroux.fr (chicorée à racine), www.jacques-briant.fr (chicorée scarole)

Figure i.30 : Martyr de saint Sébastien, tableau de l'autel saint Guy de l'église des Augustins Ermites de Nuremberg (1487). (p 86)

floraurbana.blogspot.fr

Figure i.31 : Quelques documents et témoins de l'utilisation ancienne de la chicorée : une page du papyrus Ebers (A), représentation de Dioscoride (B), représentation de Galien (C), frontispice de *Naturalis historia* (édition 1669) et représentation de Pline l'ancien (D), jardin médiéval et représentation de Charlemagne (E). (p 87)

en.wikipedia.org (papyrus Ebers, frontispice de *Naturalis historia*), fr.wikipedia.org (Dioscoride, Galien, Pline l'ancien), alex-bernardini.com (Charlemagne), lesamisdabord.xooit.fr (jardin médiéval).

Figure i.32 : Les variétés de chicorée à feuilles de l'espèce *Cichorium intybus*. (p 89)

cookeasy.unblog.fr ('Chioggia'), www.graines-grelin-grelinette.com ('Treviso'), pepinieredescarlins.com ('Verona'), www.italienpasta.com ('Castelfranco'), www.graines-schletzer.com ('Grumolo'), beurresale.canalblog.com ('Catalogna'), www.plantes.ch ('Pan di Zuccherò'), www.lhotellerie-restauration.fr ('barbe de capucins'), johan.lemarchand.free.fr (carte Italie)

Figure i.33 : Forçage de chicons (pleine terre ou hydroponie). (p 90)

georis.canalblog.com (chicons), www.biofil.fr (forçage en couche), www.mphalempin.com (évolution chicon), www.gode.fr (forçage en salle)

Figure i.34 : Produits dérivés de la chicorée à café. (p 91)

www.keldelice.com (chicorée en grains), www.carrefour.fr (chicorée soluble), blog.aufeminin.com (ricorée), nancray.proximarche.com (chicorée liquide)

Figure i.35 : Structures chimiques de l'inuline (A) et de la carboxyméthylinuline (B). (p 93)
fr.wikipedia.org (inuline), Boels et Witkamp, 2011 - page 4156 (carboxyméthylinuline)

Figure i.36 : Diverses autres valorisations des racines de *Cichorium intybus* var. *sativum*. (p 94)
www.italienische-samen.de (chicorée de Soncino), www.leroux.fr (chicorée à racine),
www.leroux.com (farine), prop-dog.e-monsite.com (croquettes)

Figure i.37 : Principaux métabolites spécialisés de la chicorée (formes non glycosylées). (p 97)

Figure i.38 : Schéma simplifié présentant la synthèse des acides hydroxycinnamiques chez les plantes. (p 101)

Figure i.39 : Voie de biosynthèse simplifiée de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane (A) et voie de biosynthèse de l'acide shikimique. (p 103)
Maeda et Dudareva, 2012 - page 77 (voie de biosynthèse de l'acide shikimique)

Figure i.40 : Schéma de la voie des phénylpropanoïdes. (p 104)

Figure i.41 : Voie de biosynthèse hypothétique des polyphénols de chicorée. (p 108)
www.fotocommunity.fr (*C. intybus*), fr.wikipedia.org (*E. purpurea*), www.mesarbustes.fr (*V. vinifera*),
www.espresso.si (*C. canephora*),

Chapitre 1 : Caractérisation chimique du matériel végétal et recherche de conditions modulatrices de l'accumulation des composés phénoliques chez la chicorée

Figure 1.1 : Plantules de chicorée âgées de quatre jours cultivées sur papier filtre imbibé de milieu MS 0,5x en chambre de culture. (p 116)

Figure 1.2 : Système utilisé pour la culture en conditions hydroponiques de chicorées. (p 117)

Figure 1.3 : Système d'incubation d'explants foliaires de chicorée. (p 117)

Figure 1.4 : Système d'incubation de plantules de chicorée sur microplaques. (p 118)

Figure 1.5 : Graines de chicorée à différents stades de germination. (p 120)

Figure 1.6 : Gradients d'élution des 3 méthodes de séparation utilisées en HPLC. (p 122)

Figure 1.7 : Quantité de matière sèche par plante ou par organe (A) et rapport entre la matière sèche des parties aériennes et la matière sèche des parties racinaires (B) des plantes de chicorée âgées de 3 semaines cultivées sur du milieu nutritif MS à différentes concentrations. (p 125)

Figure 1.8 : Présentation schématique de la relation entre un apport croissant en nutriments, le développement de la plante et la susceptibilité d'infection de la plante. (p 125)
Marschner, 2012.

Figure 1.9 : Chromatogrammes d'extraits méthanoliques de feuilles et de racines de chicorée ainsi que d'un mélange de standards. (p 127)

Figure 1.10 : Comparaison des acides chlorogénique (3-O-caféoylquinique) et néochlorogénique (5-O-caféoylquinique). (p 128)

Figure 1.11 : Chromatogrammes d'extraits méthanoliques de feuilles et de racines de chicorée et d'une solution de 5-CQA commercial. (p 129)

Figure 1.12 : Caractéristiques d'identification des 3-CQA, 5-CQA et CTA de chicorée lors d'analyses par HPLC. (p 129)

Figure 1.13 : Teneurs en esters d'acide caféique des racines et des parties aériennes de plantes de chicorée âgées de 4 semaines. A : teneurs en CQA et diCQA, B : teneurs en CTA/5-CQA et diCTA. (p 130)

Figure 1.14 : Evolution des teneurs en CQA, diCQA (A), CTA/5-CQA et diCTA (B) au cours des premiers stades de la germination de la chicorée. (p 131)

Figure 1.15 : Evolution des teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA des racines et des feuilles de jeunes plantes de chicorée. (p 132)

Figure 1.16 : Schéma descriptif de la préfoliation de la chicorée (insertion imbriquée des feuilles les unes par rapport aux autres) (A) et photographies présentant l'organisation en rosette d'une plante de chicorée (B). (p 133)

Rameau *et al.*, 1989 (schéma), photographies : G. Legrand.

Figure 1.17 : Photographies présentant une dissection d'une plante de chicorée âgée de 6 semaines. (p 134)

Photographies : G. Legrand.

Figure 1.18 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA dans les différents étages foliaires de plantes de chicorée. (p 135)

Figure 1.19 : Chromatogramme d'extraits méthanoliques de jeunes feuilles, de feuilles âgées de chicorée, d'une solution commerciale d'acide néochlorogénique (5-CQA) et d'un mélange de molécules commerciales (CTA et CQA). (p 136)

Figure 1.20 : Teneurs en composés phénoliques dans des disques foliaires de chicorée incubés ou non pendant 24 h sur le milieu de culture. (p 138)

Figure 1.21 : Quantifications des composés phénoliques dans des disques foliaires de chicorée incubés ou non pendant 24 h sur un milieu de culture. (p 139)

Figure 1.22 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA des disques foliaires de chicorée en fonction du temps d'incubation. (p 140)

Figure 1.23 : Concentration interne en CQA de disques foliaires de chicorée en fonction du temps d'incubation. (p 141)

Figure 1.24 : Incubation pendant 24 h de disques foliaires dans un milieu supplémenté de CQA à diverses concentrations (0 ; 0.5 et 1 mM). (p 142)

Figure 1.25 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA de disques foliaires de chicorée ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}$) en fonction de la concentration en acide tartrique du milieu d'incubation (mM). (p 143)

Figure 1.26 : Microplaques avec plantules de chicorée âgées de 9 jours (A) et teneurs en polyphénols des plantules (B). (p 144)

Photographie : G. Legrand

Figure 1.27 : Test de brunissement du milieu d'incubation des plantules sous 3 modalités : plantules dans du milieu MS 0,5x + 1 mM CQA (A), plantules dans du milieu MS 0,5x (B) et milieu MS 0,5x + 1 mM CQA sans plantules (C). (p 145)

Photographie : G. Legrand

Figure 1.28 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA de plantules de chicorée en fonction de la concentration en acide tartrique (trait discontinu) ou phénylalanine (trait continu) du milieu d'incubation. (p 146)

Figure 1.29 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA des disques foliaires de chicorée en fonction du temps d'incubation. (p 149)

Figure 1.30 : Conséquences d'un stress salin sur la plante. (p 152)

Figure 1.31 : Impact sur la croissance de différentes espèces végétales d'un stress salin de différentes intensités. (p 154)

Shabala et Munns, 2012 – p 68 (livre Plant stress physiology édité par Sergey Shabala)

Figure 1.32 : Evolution du pourcentage de germination des graines de chicorée déposées sur des milieux additionnés de NaCl à concentrations croissantes. (p 156)

Photographies : G. Legrand

Figure 1.33 : Evolution du pourcentage de germination des graines de chicorée mises à germer en présence de différentes molécules. (p 158)

Figure 1.34 : Pourcentage de graines germées en fonction du temps (en heures). (p 159)

Figure 1.35 : Contenus en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA au cours de la germination de graines en présence ou non de NaCl 100 mM. (p 160)

Figure 1.36 : Effet de l'application d'un choc salin d'intensités croissantes pendant 14 jours sur des plantes de chicorée âgées de 6 semaines à l'issue du traitement. A : Photographies des plantes, B : Masse sèche des plantes. (p 162)

Photographie : G. Legrand

Figure 1.37 : Evolution des teneurs en proline dans les feuilles de plantes de chicorées traitées ou non par du NaCl 200 mM pendant 6 jours. (p 163)

Figure 1.38 : Evolution des teneurs en CQA et diCQA (A) et CTA/5-CQA et diCTA (B) dans les racines et feuilles de chicorées ayant subi (trait discontinu) ou non (trait continu) un stress salin (NaCl 200 mM). (p 164)

Photographies : G. Legrand

Chapitre 2 : Clonage et caractérisation biochimique de cinq hydroxycinnamoyltransférases impliquées dans la synthèse de l'acide chlorogénique chez la chicorée

Figure 2.1 : Phylogénie et distribution des acyltransférases de la famille des BAHD. (p 174)

Tuominen *et al.*, 2011 – p 3

Figure 1 (publication). Putative metabolic pathways involved in hydroxycinnamic acid biosyntheses in plants. (p 206)

Figure 2 (publication). Chromatograms of crude methanolic extracts from leaves and roots of chicory seedlings and of a standard mixture. (p 208)

Figure 3 (publication). Contents of 3-CQA, CTA, diCTA and 3,5diCQA in roots and leaves (different ages) of chicory seedlings. (p 210)

Figure 4 (publication). Contents of 3-CQA, 5-CQA and 3,5-diCQA in chicory cell cultures under different conditions. (p 211)

Figure 5 (publication). Phylogenetic analysis and sequence comparison of the five members of the BAHD family identified in this study. (p 212)

Figure 6 (publication). Expression and purification of recombinant HCT and HQT proteins. (p 214)

Figure 7 (publication). Expression of HCT1, HCT2, HQT1, HQT2 and HQT3 in various chicory tissues. (p 215)

Figure 2.2 : Carte du vecteur de transformation pB2GW7. (p 221)
thèse A. Taylor, 2009 – p 35

Figure 2.3 : Séquences des amorces utilisées pour la vérification de l'insertion des gènes d'intérêt CiHCT1 et CiHQT1 chez *A. thaliana*. (p 223)

Figure 2.4 : Agroinfiltration de feuilles de tabac. (p 224)
photographie : D. Gagneul

Figure 2.5 : Détermination du pH réactionnel optimal pour CiHCT1 (A) et CiHQT1 (B). (p 225)

Figure 2.6 : Chromatogramme d'extrait méthanolique de feuilles d'*Arabidopsis* transformée avec le transgène CiHCT1 et ciblage des pics majoritaires. (p 226)

Figure 2.7 : Chromatogrammes d'extrait méthanolique de feuilles d'*Arabidopsis* transformée avec le transgène CiHCT1 et ciblage des pics minoritaires. (p 227)

Chapitre 3 : Vers l'identification de l'enzyme responsable de la conversion d'acide chlorogénique en acide isochlorogénique chez la patate douce

Figure 3.1 : Réactions enzymatiques conduisant à la synthèse d'AdiCQ (ici le diCQA). (p 235)
Fond-ecran-image.com (caféier), www.gerbeaud.com (pied de tomate), camerdish.e-monsite.com (patate douce)

Figure 3.2 : Chromatogrammes obtenus après incubation de CiHQT1 recombinantes en présence de CQA et CoASH et spectre d'absorption du caféoyl-CoA produit. (p 241)

Figure 3.3 : Chromatogrammes obtenus à l'issue de l'incubation des HCTs et HQTs recombinantes en présence de CQA uniquement, à pH 6 (A) et 7,2 (B). (p 242)

Figure 3.4 : Alignement de séquences appartenant à la famille des HCT et HQT de plantes. (p 244)

Figure 3.5 : Réaction enzymatique catalysée par l'isochlorogénate synthase (ICS) chez la patate douce. (p 246)
Villegas *et al.* 1987 – p 1577

Figure 3.6 : Chromatogramme obtenu par HPLC-UV d'extraits méthanoliques de disques de racines de patate douce incubés pendant 4 jours à l'obscurité (en rouge) ou non incubés (en bleu). (p 248)

Figure 3.7 : Evolution des abondances relatives en CQA et en diCQA en fonction de la durée d'incubation des disques de patate douce par rapport au t0. (p 248)

Figure 3.8 : Chromatogrammes obtenus par HPLC-UV de mélange de standards et d'extrait résultant d'un test enzymatique à partir d'extrait protéique de patate douce. (p 250)

Figure 3.9 : Spectres d'absorption obtenus par HPLC-UV des différents standards (CQA et diCQA) et du produit de réaction obtenu après incubation d'extrait protéique de racines de patate douce avec du CQA. (p 251)

Figure 3.10 : Evolution des concentrations de CQA et de diCQA (respectivement en mM et μM) dans un milieu réactionnel contenant 1 ou 0,5 mM de CQA et un extrait protéique dessalé de racines de patate douce. (p 252)

Figure 3.11 : Evolution des concentrations en CQA et diCQA (respectivement en mM et μM) en fonction du temps dans un milieu réactionnel contenant soit un extrait brut de patate douce bouilli (trait discontinu) ou non (trait continu). (p 253)

Figure 3.12 : Concentration en diCQA (en μM) en fonction du temps dans un milieu réactionnel contenant du CQA et un extrait protéique de patate douce. (p 255)

Figure 3.13 : Activité enzymatique de différentes fractions d'extrait protéique de patate douce obtenues par fractionnement au sulfate d'ammonium. (p 256)

Figure 3.14 : Concentration en diCQA (en μM) produit en fonction du temps de réaction enzymatique (en min) pour différentes fractions issues du protocole de purification de l'ICS. (p 256)

Figure 3.15 : Vitesse de synthèse du diCQA (en $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$) en fonction du pH du milieu enzymatique et de la nature du pH. (p 257)

Figure 3.16 : Concentrations en CQA et diCQA (respectivement en mM et μM) en fonction du temps de réaction enzymatique (en min) pour les deux tampons de resolubilisation après saturation au sulfate d'ammonium (40%). (p 259)

Figure 3.17 : Principe de la chromatographie par exclusion. (p 260)
biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e.html

Figure 3.18 : chromatogrammes obtenus par FPLC-UV après passage d'un extrait protéique de patate douce. (p 262)

Figure 3.19 : Concentrations en diCQA (en μM) produit en fonction du temps de réaction enzymatique (en min) pour les différentes fractions isolées en sortie de colonne Sephadex G-50 décrite dans la figure 3.18. (p 262)

Figure 3.20 : Résultats obtenus lors de la chromatographie de l'échantillon sur une colonne Sephadex G-50 de 92 cm. (p 264)

Photographie : G. Legrand

Figure 3.21 : Chromatogramme (280 nm) obtenu en sortie de colonne Sephadex G-50, 92 cm après injection d'un extrait protéique de patate douce (injection de 20 mg de protéines). (p 265)

Figure 3.22 : Tests enzymatiques en présence de CQA réalisés à partir d'une fraction protéique concentrée issue de la séparation sur colonne Sephadex G50 – 92 cm. (p 266)

Figure 3.24 : Principe de chromatographie par échange d'ions. (p 267)

biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e.html

Figure 3.25 : Schéma explicatif pour la mise au point d'une méthode de séparation des protéines sur colonne échangeuse d'ions. (p 268)

www.sigmaaldrich.com

Figure 3.26 : Chromatogrammes (en bleu) obtenus par FPLC-UV après optimisation du protocole pour l'élution des protéines injectées sur la colonne Sepharose DEAE. (p 269)

Figure 3.27 : Absorbance à 280 nm obtenue en sortie de colonne Sepharose G-50, 92 cm après injection d'un extrait protéique de patate douce. (p 270)

Figure 3.28 : Chromatogrammes obtenus par FPLC-UV après optimisation du protocole d'élution des protéines injectées sur la colonne Sepharose DEAE – allongement du temps d'élution à 15 % de NaCl. (p 271)

Figure 3.29 : Gel SDS-PAGE 12,5% d'acrylamide sur lequel sont déposées les différentes fractions isolées au cours du protocole de purification de l'ICS. (p 227)

Figure 3.30 : Bilan du protocole de purification de l'ICS à partir de patate douce. (p 272)

Figure 3.31 : Tests enzymatiques sur fragments de gel SDS-PAGE. (p 273)

Figure 3.32 : Tests enzymatiques sur fragments de gel SDS-PAGE : sans utilisation d'agent réducteur (A), Ajout de β -mercaptoéthanol (5 %) dans le tampon de charge (B), Ajout de DTT (100 mM) dans le tampon de charge (C). (p 275)

Figure 3.33 : Tests enzymatiques sur fragments de gel IEF. (p 276)

Figure 3.34 : Tests enzymatiques sur fragments de gel SDS et mise en évidence des bandes envoyées au séquençage. (p 277)

Figure 3.36 : (A) Expression génique des lipases 1 et 2 (rpm – rends per million) de cultures cellulaires de racines de chicorée dans 3 conditions : témoin avant élicitation (T0), élicitation 24 h

au MeJA (MeJA-24), élicitation 24 h à l'éthanol (EtOH-24), témoin après 24 h sans élicitation (MS-24)

(B) Organisation génomique des deux séquences identifiées chez la chicorée et proche de celle mise en évidence chez la patate douce. (p 280)

Figure 3.37 : Alignement des séquences en acides aminés des lipases 1 et 2 et mise en évidence du peptide signal et du motif catalytique sérine chez la lipase 1. (p 281)

Figure 3.38 : Tests enzymatiques réalisés dans des milieux enrichis en PMSF. (p 282)

Figure 3.39 : Réaction de transfert catalysée par la SICGT. (p 284)

Teutschbein *et al.*, 2014 – p 38375

Liste des tableaux :

Introduction

Tableau i.1 : Classification des alcaloïdes en fonction de leur structure et de leur origine biosynthétique. (p 240)

Tableau i.2 : Les composés phénoliques de *Cichorium intybus* et données UV-visible, MS et MSⁿ. (p 99-100)

Carazzone *et al.*, 2013 – p 1064-1065

Chapitre 1 : Caractérisation chimique du matériel végétal et recherche de conditions modulatrices de l'accumulation des composés phénoliques chez la chicorée

Tableau 1.1 : Paramètres caractéristiques de la germination pour *Cichorium intybus* et *Arabidopsis thaliana*. (p 157)

Chapitre 2 : Clonage et caractérisation biochimique de cinq hydroxycinnamoyltransférases impliquées dans la synthèse de l'acide chlorogénique chez la chicorée

Table I (publication). Caffeic acid ester content in leaves and roots of 6-week-old plants of chicory. (p 216)

Table II (publication). Competition assays to determine the preferred acyl acceptor of HCTs and HQTs. (p 217)

Table III (publication). Kinetic parameters of HCTs and HQTs from chicory. (p 218)

Table IV (publication). Sequence of primers used in this study. (p 219)

Chapitre 3 : Vers l'identification de l'enzyme responsable de la conversion d'acide chlorogénique en acide isochlorogénique chez la patate douce

Tableau 3.1 : Protocole de purification de l'ICS chez la patate douce. (p 247)

Villegas *et al.* 1987 – p1578

Tableau 3.2 : Structures chimiques de l'Hepes et du Tris. (p 258)

Tableau 3.3 : Fiche technique de la colonne Sephadex G50 – 22 cm et conditions d'utilisation. (p 261)

Tableau 3.4 : Fiche technique de la colonne Sephadex G50 – 92 cm et conditions d'utilisation. (p 263)

Introduction générale

1 Les végétaux : source inépuisable de produits naturels exploités par l'Homme

Fruits et légumes : au moins 5 fois par jour ! C'est ce qui est hautement recommandé par les politiques nationales de nutrition-santé (www.manger-bouger.fr – figure i.1) ! Boire du thé vert, manger du chocolat de temps en temps, savourer un bon verre de vin au quotidien ont été déclarés comme des habitudes augmentant l'espérance de vie. Pourquoi ? Une classe de composés chimiques, d'origine naturelle, présents chez les végétaux est considérée comme en partie responsable de ces effets bénéfiques : les polyphénols (ou composés phénoliques) ! Ils font partie d'une grande famille de molécules, les métabolites spécialisés des végétaux (ou métabolites secondaires).



Figure i.1 : Campagne de communication lancée en 2001 dans le cadre du programme national nutrition santé (PNNS) par l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA). Depuis, l'AFSSA est devenue ANSES, agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Les plantes produisent et accumulent un ensemble de composés d'une remarquable diversité, généralement regroupés sous ce vocable des métabolites secondaires. Le nombre de structures décrites excède 100 000, sachant que la réalité est sans doute encore bien éloignée de cette estimation. En effet, seules 20 à 30 % des plantes ont été étudiées d'un point de vue biochimique (Dixon, 2001 ; Wink, 2011). Contrairement aux métabolites primaires (acides aminés, nucléotides...), qui sont essentiels pour la croissance et le développement des végétaux, les métabolites dits secondaires sont généralement présents dans un nombre limité d'espèces végétales et de ce fait semblent non essentiels pour la physiologie de la plante. Historiquement, cette caractéristique a conduit les biologistes des plantes à considérer que ces métabolites étaient des déchets du métabolisme par analogie au monde animal. Cette théorie n'a été que très tardivement remise en cause. Dans les années 1970 - 1980, deux théories s'opposent quant au rôle des métabolites secondaires. Kurt Mothes, un biologiste allemand, défend une théorie neutraliste de l'évolution et considère que ces composés n'ont pas de signification physiologique. Miriam Rothschild, une entomologiste, et Jeffrey Harborne, un chimiste, tous deux britanniques, développent une nouvelle discipline, l'écologie chimique. D'après eux, les métabolites secondaires jouent un rôle capital dans les interactions de la plante avec son environnement. Si l'intérêt des physiologistes pour ces composés a tardé à émerger, celui des chimistes et pharmaciens a été plus rapide à naître. Ceci est lié aux propriétés pharmaceutiques et médicales exceptionnelles de ces molécules. La morphine, par exemple, est isolée en 1806 par Friedrich Sertürner, un pharmacien allemand. Ces molécules sont à ce moment qualifiées de produits naturels des plantes ou métabolites secondaires. Depuis quelques années, il est devenu évident que ces composés ont un rôle important à jouer dans la plante qui les produit. Ils peuvent avoir un rôle de composé signal au sein de la plante ou entre plantes, ou encore entre la plante qui les produit et des herbivores, ou des prédateurs d'herbivores... Certaines de ces molécules ont également un rôle non négligeable dans la pollinisation et la dispersion des semences (Wink, 2011) car ils contribuent à l'odeur, au goût et à la couleur caractéristique des plantes. De tels métabolites, considérés dans le passé comme des produits « déchets » voire des « erreurs » résultant du métabolisme primaire, sont donc de plus en plus décrits comme ayant des rôles importants pour la plante (Bennet et Wallsgrove, 1994 ; Agati *et al.*, 2012 ; Ferdinando *et al.*, 2014).

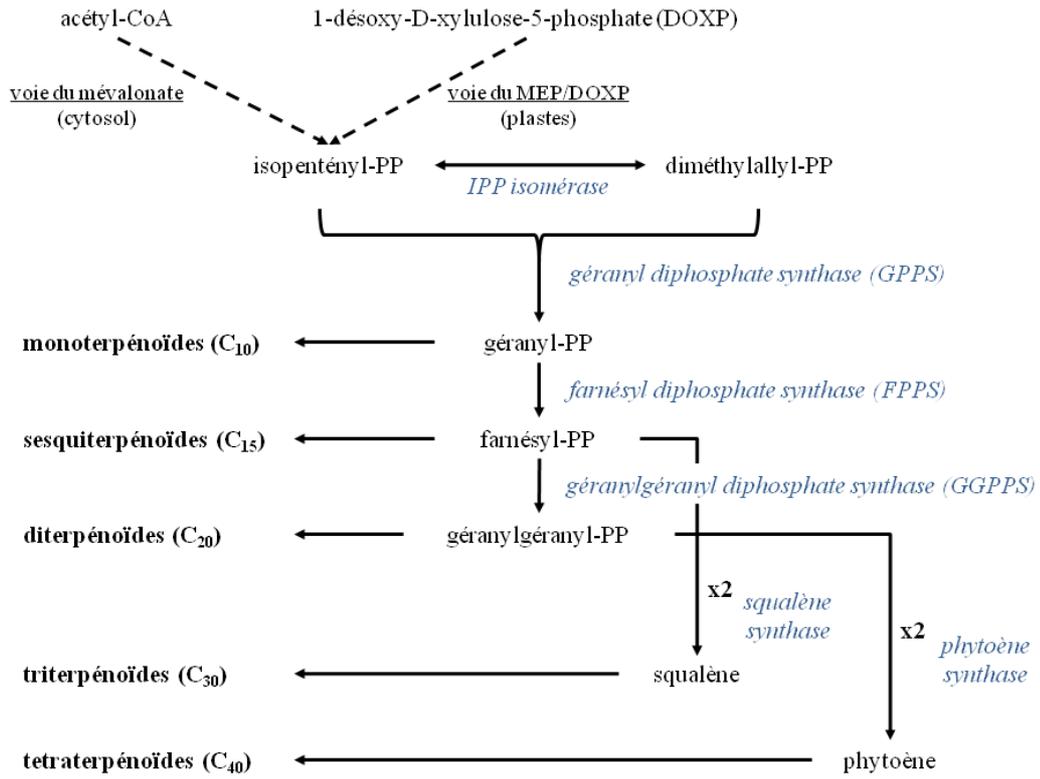
En ce sens, au vu de ces fonctions qui s'avèrent importantes, la frontière entre métabolites primaire et secondaire a en partie perdu de son étanchéité. C'est pourquoi, le terme de métabolite spécialisé est aujourd'hui adopté par la communauté scientifique pour qualifier les métabolites secondaires. Le qualificatif spécialisé est utilisé pour indiquer la spécialisation de ces composés dans leur rôle physiologique et la grande spécificité taxonomique de cette famille de molécules. Dans la suite de ce manuscrit, le terme de métabolite spécialisé sera donc préféré à celui de métabolite secondaire.

Trois principales catégories de molécules sont regroupées sous ce terme de métabolites spécialisés : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques.

1.1 Les terpénoïdes

Les terpénoïdes (ou terpènes) regroupent un ensemble de molécules très différentes tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. Avec plus de 40 000 molécules connues, ils constituent probablement la classe la plus vaste et la plus diversifiée de composés organiques végétaux (Aharoni *et al.*, 2005). Les terpénoïdes sont également connus sous le nom d'isoprénoïdes car leur dégradation thermique libère un gaz, l'isoprène. Les terpénoïdes sont répartis dans différentes classes selon le nombre d'atomes de carbone qu'ils contiennent : hémiterpénoïdes (C_5), monoterpénoïdes (C_{10}), sesquiterpénoïdes (C_{15}), diterpénoïdes (C_{20}), triterpénoïdes (C_{30}), tétraterpénoïdes (C_{40}) et polyterpénoïdes ($>C_{40}$) (figure i.2). L'isopentényl diphosphate (IPP), une molécule à cinq carbones, est le précurseur de tous les terpènes. Chez les plantes, l'IPP est produit par deux voies métaboliques aux localisations subcellulaires différentes : la voie du mévalonate (cytosolique) et la voie du MEP/DOXP (2-C-méthylérythritol-4-phosphate / 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate) qui est plastidique (Vranová *et al.*, 2013). Une classe d'enzymes dénommées prényltransférases entre en jeu dans la synthèse des monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes et diterpénoïdes. Ces enzymes catalysent le transfert des unités IPP à des accepteurs allyliques diphosphate (Akhtar *et al.*, 2013). Parmi celles-ci, la géranyl diphosphate synthase catalyse la formation de géranyl diphosphate (IPP + diméthylallyl diphosphate), la farnésyl diphosphate synthase, la formation de farnésyl diphosphate (géranyl diphosphate + 1 unité IPP) et la géranylgéranyl diphosphate synthase, la formation de géranylgéranyl diphosphate (farnésyl diphosphate + 1 unité IPP). D'autres enzymes interviennent pour la synthèse des triterpénoïdes et des tétraterpénoïdes. La squalène synthase catalyse la formation du squalène résultant de l'association de deux farnésyl diphosphates (Liang *et al.*, 2002). De même, la conversion de géranylgéranyl diphosphate en phytoène est catalysée par la phytoène synthase et constitue la première étape dans la biosynthèse des caroténoïdes (Fraser *et al.*, 2002).

A



B

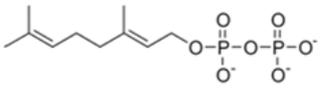
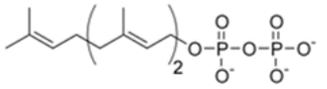
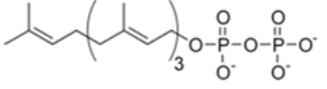
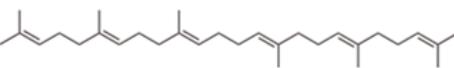
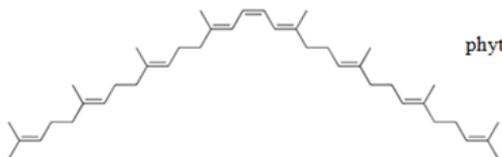
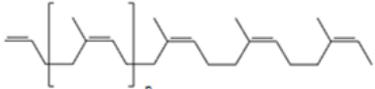
nom	nombre d'unités C ₅	exemples
hémiterpénoïdes	1	 isoprène
monoterpénoïdes	2	 géranyl diphosphate
sesquiterpénoïdes	3	 farnésyl diphosphate
diterpénoïdes	4	 géranylgeranyl diphosphate
triterpénoïdes	6	 squalène
tétraterpénoïdes	8	 phytoène
polyterpénoïdes	> 8	 caoutchouc

Figure i.2 : Voie de biosynthèse simplifiée des terpénoïdes (A) et classification des terpénoïdes en fonction du nombre d'unités en C₅ (B).

La voie de biosynthèse des isoprénoïdes génère à la fois des composés primaires et spécialisés, importants pour la croissance et le développement de la plante. Ils sont dotés également d'un rôle essentiel dans la fluidité des membranes, la respiration et la photosynthèse (Vranová *et al.*, 2013). Parmi les composés primaires, on retrouve des phytohormones, telles que les gibbérellines, l'acide abscissique et les cytokinines. De cette voie sont issus également les caroténoïdes, les chlorophylles et les plastoquinones impliqués dans la photosynthèse, les ubiquinones nécessaires à la respiration et les stérols qui influencent la structure des membranes. Les terpénoïdes jouent également un rôle important dans les interactions de la plante avec son environnement : entre plantes, entre plantes et micro-organismes, entre plantes et insectes. Certains composés tels que des triterpénoïdes, ou des diterpénoïdes, sont, en effet, impliqués dans des processus de résistance aux insectes (Langenheim, 1994). Les terpénoïdes peuvent être produits pour attirer des pollinisateurs et des animaux dans le but de disperser des semences (Vranová *et al.*, 2013). Ils sont utilisés par l'Homme pour le parfum qu'ils confèrent dans l'alimentation ou les produits cosmétiques (menthol, sclaréol...). En effet, ils contribuent à la flaveur des fruits et à la fragrance des fleurs, comme le linalol donnant l'odeur caractéristique du muguet (Pichersky *et al.*, 1994). De plus, les terpénoïdes peuvent avoir des propriétés médicinales : anti-cancérogène comme le taxol (Wani *et al.*, 1971), anti-malaria comme l'artémisinine (Klayman, 1985), anti-ulcéreuse comme la zingibérène (Yamahara *et al.*, 1983), anti-microbienne comme l' α -pinène (Mastelic *et al.*, 2005)...

Ces composés ont une importance commerciale et écologique. Les efforts des scientifiques se portent sur la modulation des contenus de ces ressources moléculaires dans la plante. Ainsi des recherches sont menées dans l'optique d'apporter une meilleure résistance du végétal face aux attaques de pathogènes, d'améliorer la fragrance de plantes ornementales, d'améliorer les arômes de fruits et légumes et d'augmenter la production de produits pharmaceutiques dans les plantes.

1.2 Les alcaloïdes

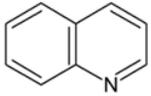
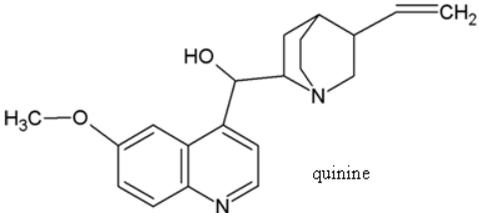
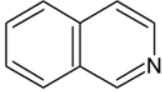
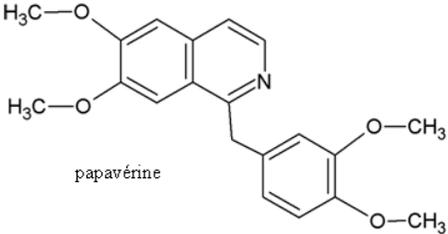
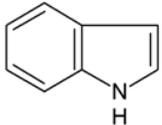
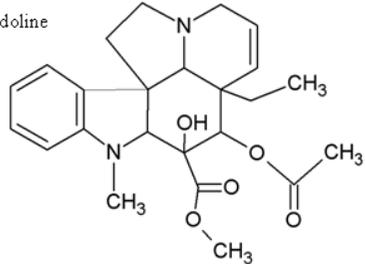
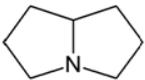
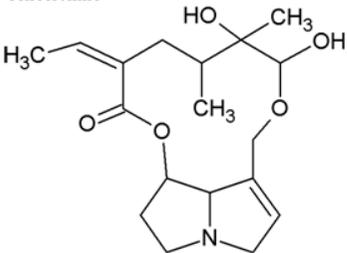
Les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement très hétérogènes. Leurs caractéristiques communes sont leur solubilité dans l'eau, la présence dans leur structure d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique. On distingue ainsi trois grandes classes selon qu'ils possèdent ou non un acide aminé comme précurseur direct et qu'ils comportent ou non un atome d'azote dans un hétérocycle (tableau i.1). L'atome d'azote est très souvent protoné, ce qui confère à ces molécules un caractère légèrement basique en solution, d'où leur nom d'alcaloïdes.

Les alcaloïdes sont généralement classés en fonction de la nature du cycle qui prédomine dans la molécule (figure i.3). Malgré leur structure variée, les alcaloïdes proviennent d'un petit nombre de précurseurs simples. La plupart d'entre eux sont synthétisés à partir d'acides aminés tels que la tyrosine, le tryptophane, l'ornithine... La plupart des espèces végétales possède leur propre panoplie d'alcaloïdes.

Tableau i.1 : Classification des alcaloïdes en fonction de leur structure et de leur origine biosynthétique

	dérivé d'acide aminé	hétérocycle azoté
alcaloïdes vrais	oui	oui
proto-alcaloïdes	oui	non
pseudo-alcaloïdes	non	-

On attribue généralement aux alcaloïdes un rôle de défense pour le végétal. La plupart d'entre eux ont un goût amer, si bien qu'ils sont caractérisés comme composés répulsifs vis-à-vis des animaux et insectes (Hartmann, 1991). Certains alcaloïdes sont fortement toxiques. La nicotine, par exemple, est un poison violent pour les insectes et a été l'un des premiers insecticides utilisés par l'Homme. Beaucoup d'alcaloïdes possèdent des propriétés antibiotiques et sont actifs contre les infections microbiennes (Yang *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2014).

classe d'alcaloïde	exemple	autres composés
quinoléine	 	quinine
isoquinoléine	 	morphine codéine berbérine
indole	 	vinblastine réserpine strychnine
pyrrolizidine	 	rétrorsine

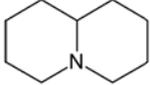
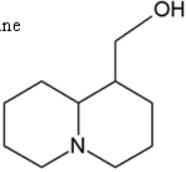
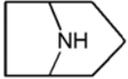
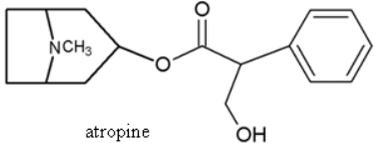
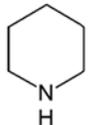
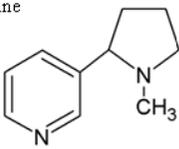
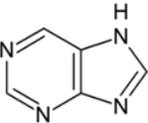
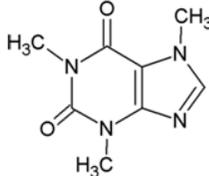
classe d'alcaloïde	exemple	autres composés
quinolizidine	 	cytisine
tropane	 	scopolamine cocaine
pipéridine	 	coniine
purine	 	caféine

Figure i.3 : Les principales classes d'alcaloïdes. La structure de base du cycle ainsi que des exemples représentatifs sont figurés.

Les concentrations en alcaloïdes sont très faibles à l'échelle de la plante, mais elles peuvent être très élevées dans certains organes ou certains tissus en particulier. Souvent les structures qui accumulent des alcaloïdes sont celles qui sont impliquées dans la survie de l'espèce dans son biotope (jeunes inflorescences...) ou dans celles exposées à la périphérie de la plante et qui sont les premières susceptibles d'être attaquées par des herbivores. Une molécule donnée peut être confinée dans des organes particuliers. Par exemple, les alcaloïdes isoquinoléiques, comme la morphine, la codéine et la papavérine sont trois des vingt alcaloïdes produits dans les capsules immatures du pavot à opium, *Papaver somniferum* (Dittbrenner *et al.*, 2009). Ainsi, la teneur en morphine des jeunes capsules de pavot à opium est inférieure à 2 % mais atteint 25 % dans le latex qui est exsudé lorsque la capsule est blessée (Fairbairn et Wassel, 1964).

Cette famille de molécules est particulièrement étudiée du fait de leurs propriétés pharmacologiques et médicinales exceptionnelles : antipaludéens, telle que la quinine extraite du quinquina (*Cinchona officinalis*), anticancéreux, telles que la vinblastine et la vincristine produites par la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), analgésiques, telle que la morphine obtenue à partir des capsules de pavot (*Papaver somniferum*) (Aziz *et al.*, 2014)... La forte activité biologique des alcaloïdes en fait des molécules à fort potentiel médical, mais aussi économique. La caractérisation des voies métaboliques impliquées dans leur synthèse représente un enjeu pour la recherche.

1.3 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques forment une grande famille de molécules très diverses qui vont de simples acides phénoliques à de grands polymères complexes tels que les tanins ou la lignine. La structure de base est le phénol, un cycle aromatique hydroxylé (figure i.4). Les composés phénoliques comportant plusieurs groupements hydroxyles associés à un ou plusieurs noyaux benzéniques sont qualifiés de polyphénols.

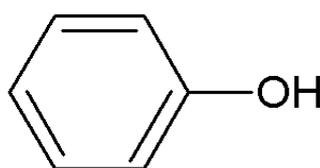


Figure i.4 : Structure de base des composés phénoliques.

De nombreux composés phénoliques semblent être impliqués dans des interactions plantes / herbivores ; certains, notamment la lignine, sont des composés structuraux importants alors que d'autres semblent n'être pour le moment que de simples métabolites terminaux ne possédant pas de fonction déterminée.

Cette classe de métabolites sera décrite dans la partie 2 de cette introduction.

Les plantes vasculaires contiennent une énorme variété de composés spécialisés dérivant d'intermédiaires ou de produits du métabolisme primaire. Leur identité est caractéristique d'une espèce voire d'une famille. La distribution restrictive de tels composés permet de constituer un critère de reconnaissance taxonomique.

Davantage de connaissances sont nécessaires, dans tous les aspects de la biologie – physiologie, biochimie, écologie – pour aborder et comprendre, d'une façon plus intégrative, l'importance de ces

composés dans les plantes et leur fonction dans un système écologique en général. Il est important d'en savoir plus pour pouvoir les exploiter sûrement et avec efficacité. En effet, leur potentiel d'utilisation pour l'Homme est incontestable, que cela soit dans le génie agro-alimentaire, dans l'industrie pharmaceutique, dans les applications cosmétiques ou encore dans la protection des plantes.

Dans ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à la troisième classe abordée ci-avant, celle des composés phénoliques.

2 Les composés phénoliques : une ressource naturelle riche et diverse

Avant d'être appelés composés phénoliques, ces produits naturels étaient globalement regroupés sous le terme de « tanins végétaux ». On retrouve les premières mentions de ces composés dans l'encyclopédie *Historia Plantarum* écrite par Théophraste d'Eresos (IV-IIIème siècles avant Jésus-Christ). Au début du XXème siècle, non sans se confronter aux difficultés du matériel végétal et à la grande diversité de ces composés, des chimistes de l'American Leather Chemists Association (ALCA) décrivent la nature polyphénolique des tanins végétaux (figure i.5).

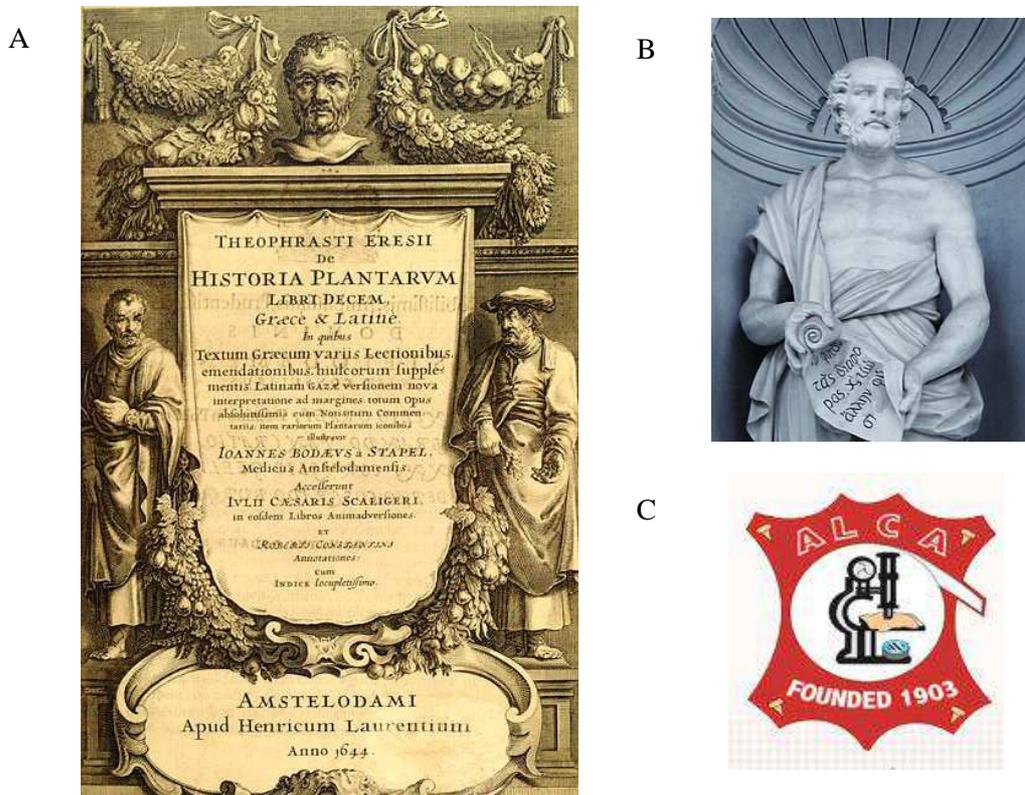


Figure i.5 : Frontispice d'une édition de 1644 de l'*Historia Plantarum* (A), statue de Théophraste d'Eresos du jardin botanique de Palerme (B) et logo de l'American Leather Chemists Association (C).

D'années en années, des botanistes, physiologistes, phytochimistes et biochimistes, tout comme des chimistes, continuèrent d'étudier ces « composés phénoliques ». Ils permirent, non seulement de définir ces composés comme métabolites majeurs et ubiquitaires chez les végétaux, mais également

de les valoriser comme composés intéressants d'un point de vue commercial. Après la seconde guerre mondiale, ils devinrent un sujet d'investigations intensives dans de nombreux domaines scientifiques liés aux végétaux : agriculture, écologie, agro-alimentaire, ou encore médecine. De nos jours, les composés phénoliques des végétaux sont dotés d'une reconnaissance toujours croissante, non seulement dans le monde scientifique, mais aussi auprès du grand public, ce qui est assez considérable. Leurs effets bénéfiques pour la santé et leur abondance dans les fruits, légumes, semences, boissons et dérivés sont des caractéristiques de plus en plus clamées auprès de la société. C'est plus exactement la capacité de ces composés à neutraliser les radicaux libres, nocifs pour la santé, qui est souvent mise en avant tout comme leur utilité à réduire les risques de certaines dégénérescences liées à l'âge ainsi que d'autres maladies.

2.1 Nature et diversité des composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent une famille très diverse sur le plan chimique, mais ceux-ci ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycle(s) benzénique(s) (C_6H_6) portant un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle(s). Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon :

- la complexité du squelette de base. Cela peut aller d'un simple cycle de six carbones à des formes très polymérisées. Cette classification sera reprise pour la suite.
- le degré de modifications de ce squelette : degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...
- les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules : glucides, lipides, protéines ou avec d'autres métabolites spécialisés pouvant être ou non des composés phénoliques.

2.1.1 Les formes simples

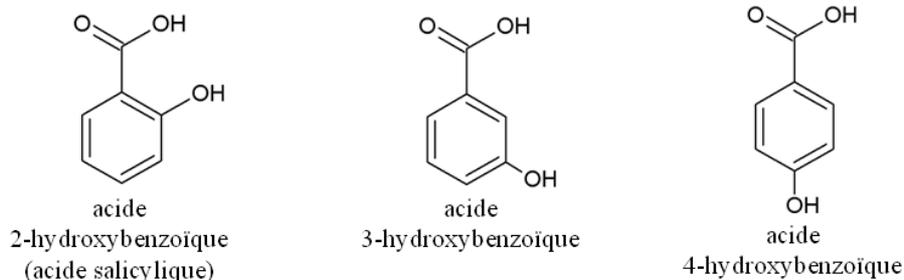
Cette catégorie regroupe des molécules dont le nombre de carbones peut varier de 6 (simple phénol en C_6 non présent naturellement chez les végétaux) à 15 (flavonoïdes en C_{15} et autres molécules proches). On peut classer dans cette catégorie les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes.

2.1.1.1. Les acides hydroxybenzoïques

L'acide hydroxybenzoïque est un composé constitué d'un cycle benzénique substitué par un groupement carboxyle et un groupement hydroxyle. Il existe sous la forme de trois isomères selon la position respective de ces deux groupes de substitution ($C_7H_6O_3$; $M = 138,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (figure i.6). L'un de ces isomères est l'acide salicylique (acide 2-hydroxybenzoïque), précurseur de l'acide acétylsalicylique (aspirine®), médicament le plus utilisé au monde. Il existe dans la nature un grand nombre d'autres dérivés de ces précurseurs, ceux-ci pouvant subir des hydroxylations et/ou méthylation. On trouve des molécules telles que l'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) ou l'acide vanillique (acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque). L'ensemble de ces

molécules constituées d'une structure de base en C6-C1 est regroupé sous le terme des « acides hydroxybenzoïques ».

acide hydroxybenzoïque : 3 isomères



Quelques dérivés :

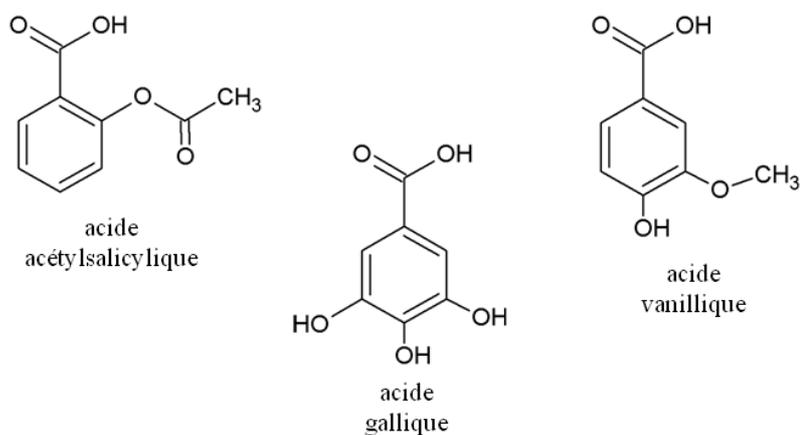


Figure i.6 : Les formes de base des acides hydroxybenzoïques et quelques dérivés.

2.1.1.2. Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques comportent une structure de base en C6-C3 dérivant de celle de l'acide cinnamique (figure i.7). Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont des éléments importants qui conditionnent la réactivité chimique de ces molécules. L'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes *trans* sont cependant naturellement prépondérantes du fait d'une plus grande stabilité (Turner *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 2011). Il est possible que les formes *cis* ne correspondent qu'à des artefacts d'extraction. Les molécules de base de la série hydroxycinnamique

sont l'acide para-coumarique (*p*-coumarique), l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide 5-hydroxyférulique et l'acide sinapique. L'ensemble est souvent rapporté sous le vocable commun des phénylpropanoïdes.

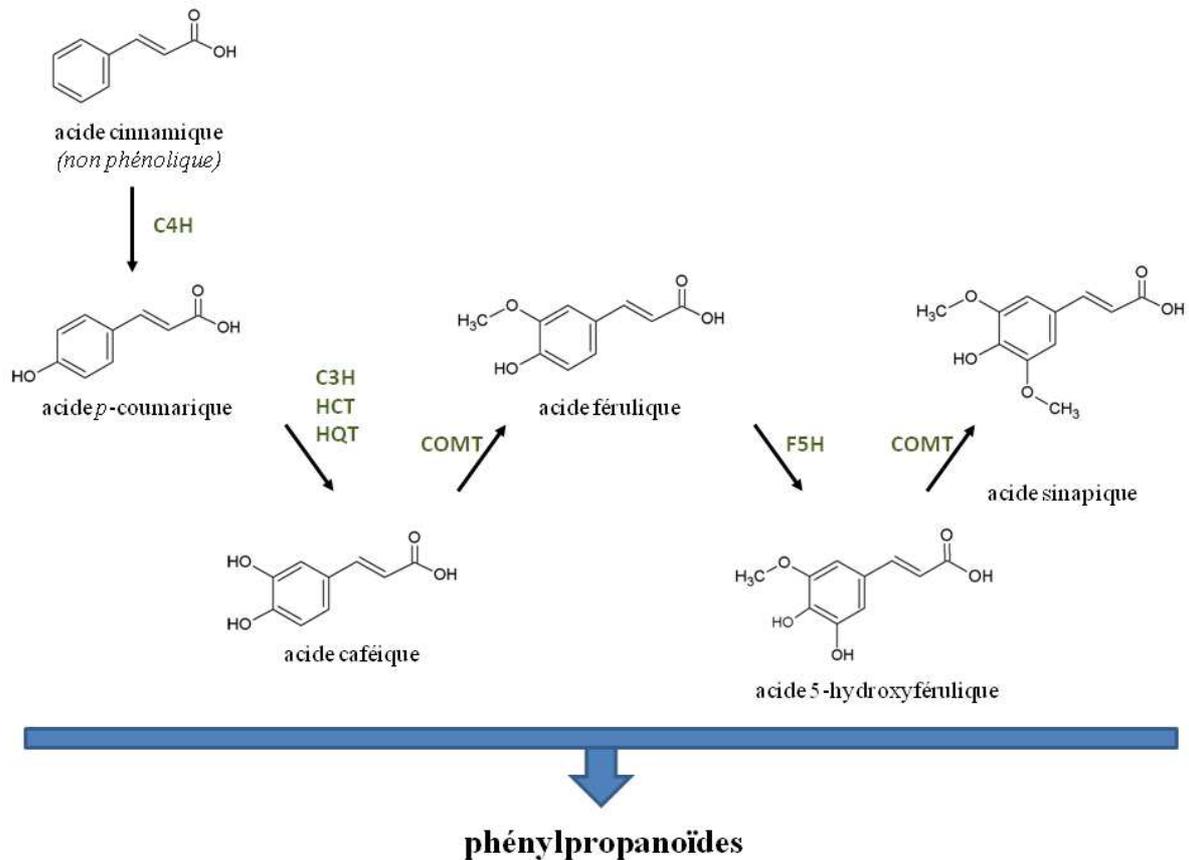
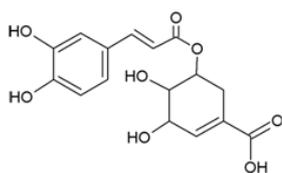


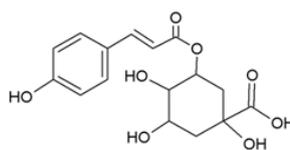
Figure i.7 : Structures chimiques de base des acides hydroxycinnamiques et enzymes impliquées dans leur synthèse. C4H : cinnamate 4-hydroxylase, C3H : *p*-coumaroyl ester 3-hydroxylase, COMT : caféate 3-*O*-méthyltransférase, F5H : férulate 5-hydroxylase, HCT : hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransférase, HQT : hydroxycinnamoyl-CoA quininate/shikimate hydroxycinnamoyltransférase.

Ces acides sont rarement présents à l'état libre et sont en général combinés à d'autres molécules organiques. Les liaisons impliquent souvent la fonction carboxylique conduisant alors à la formation d'esters (avec le glucose ou avec différents alcools-acides : acides quinique, tartrique, shikimique, malique...) ou à des phénolamides (avec des mono, di-amines ou tri-amines : tyramine, putrescine, spermidine...). Les liaisons avec les sucres peuvent se faire également par l'intermédiaire de l'une des fonctions alcooliques conduisant alors à des glucosides par l'établissement d'une liaison O-glucosidique (figure i.8).

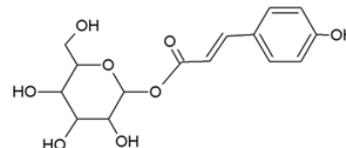
esters :



caféoylshikimate

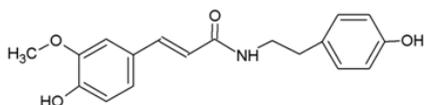


p-coumaroylquinic acid

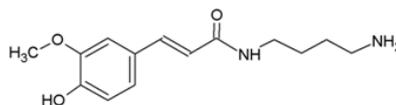


p-coumaroylglucose

phénolamides :

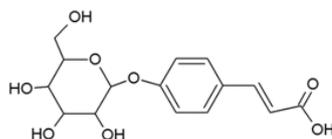


feruloyltyramine



feruloylputrescine

glucosides :



glucoside de l'acide coumarique

Figure i.8: Structures chimiques de quelques formes conjuguées des acides hydroxycinnamiques.

Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique a une répartition quasi universelle chez les végétaux. Il est souvent présent sous forme d'esters dont l'acide chlorogénique (acide 3-caféoylquinique) est le plus fréquemment rencontré. Il est également rencontré sous forme d'acide caféoyltartrique (ou acide caftarique) chez la vigne (Singleton *et al.*, 1978), d'acide caféoylshikimique chez le dattier (Mansouri *et al.*, 2005)...

Les acides hydroxycinnamiques existent aussi fréquemment sous forme d'esters multiples dont les acides dicaféoylquiniques ou tricaféoylquiniques par exemple (figure i.9).

Les acides hydroxycinnamiques peuvent être transformés en monolignols par réduction de la fonction carboxylique et participer alors à la formation des lignines.

Enfin, une cyclisation intramolécule par estérification des acides hydroxycinnamiques forme les coumarines (figure i.10). Les plantes à coumarines sont caractérisées par une douce odeur caractéristique de foin fraîchement coupé liée à la présence de ces composés.

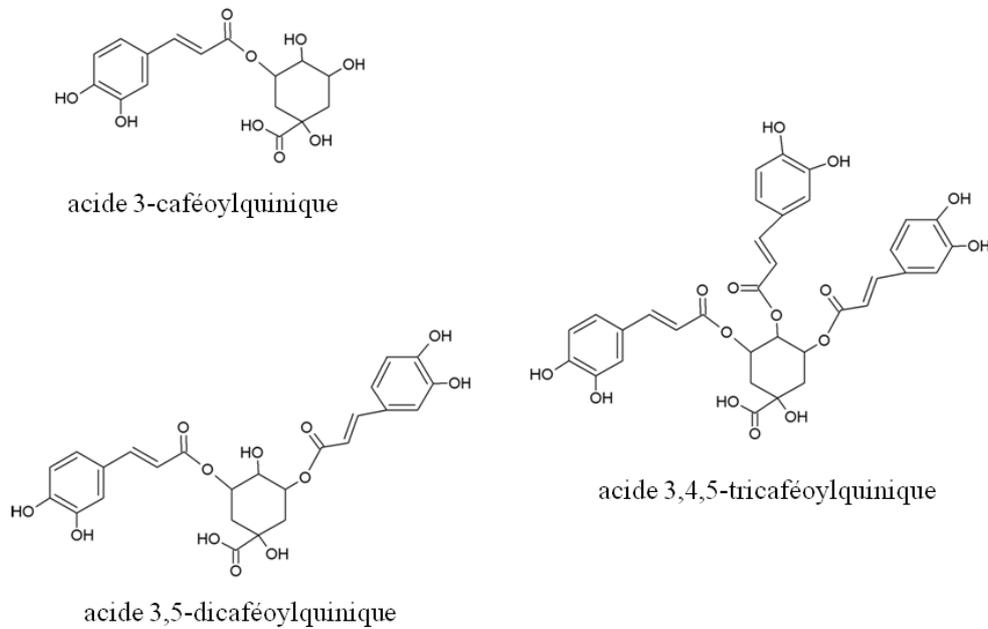
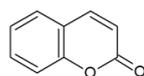


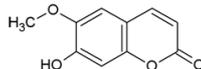
Figure i.9 : Exemple d'esters simples et multiples d'acide caféique et d'acide quinique.

Un autre groupe de composés, les stilbènes, dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques (forme C6-C2-C6). Par exemple, le resvératrol apparaît chez la Vigne en réponse à des attaques parasitaires (figure i.10) (Schouten *et al.*, 2002). Ce groupe sera détaillé dans la partie 2.1.1.4.

coumarines

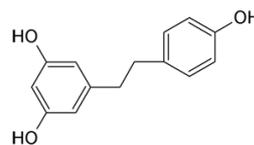


coumarine



scopolétine

stilbènes



resvératrol

Figure i.10 : Structures chimiques de la coumarine, de la scopolétine et du resvératrol. La scopolétine est la coumarine la plus répandue chez les végétaux (Taguchi *et al.*, 2000 ; Siwinska *et al.*, 2014).

2.1.1.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (Agati *et al.*, 2012). Ils sont des dérivés du phénylpropane et ont une structure générale en C₁₅ composée de deux cycles benzéniques reliés par une chaîne en C₃ (C₆-C₃-C₆) (figure i.11). Le pont à 3 carbones forme généralement un troisième cycle. C'est la structure de cet hétérocycle central et son degré d'oxydation qui permettent de distinguer les différentes classes de flavonoïdes. Il existe environ douze groupes connus de flavonoïdes qui ne diffèrent que par l'état d'oxydation du noyau hétérocyclique. Les trois principaux ensembles sont les flavones, les flavonols et les anthocyanidines (figure i.11 - A). A l'intérieur de chacune des classes, les variations autour du squelette chimique de base C₁₅ portent principalement sur trois points :

- le degré d'hydroxylation des différents cycles. Il en résulte des différences de spectre d'absorption et donc de la couleur pour les anthocyanidines et les autres pigments ;
- le niveau de méthylation : groupements O-CH₃ à la place des fonctions alcooliques ;
- le niveau de glycosylation : la plupart des flavonoïdes des végétaux sont liés à des sucres. A ce titre, ils appartiennent au groupe des hétérosides, la partie phénolique représente ici la fraction aglycone. Les conséquences de la glycosylation sont multiples. Cela peut modifier la couleur des pigments, augmenter la solubilité des molécules dans l'eau permettant alors une plus grande accumulation vacuolaire. Il peut également y avoir une modification des propriétés biologiques de ces polyphénols (acquisition d'un caractère toxique...) (Jones et Vogt, 2001).

Tous les flavonoïdes dérivent du squelette de base de la chalcone, dont la synthèse fait intervenir la chalcone synthase (CHS). Cette enzyme ubiquitaire chez les plantes catalyse la condensation puis la cyclisation de trois unités acétate provenant de la condensation décarboxylative du malonyl-CoA, sur un *p*-coumaroyl-CoA issu de la voie générale des phénylpropanoïdes (figure i.11 – C). Cette enzyme est très similaire à la stilbène synthase (STS), responsable de la synthèse des stilbènes (§ 2.1.1.4). Un troisième cycle est généralement formé par isomérisation par la chalcone isomérase (CHI). Une série d'autres transformations faisant intervenir des réductases, hydroxylases, glycosyltransférases et des acyltransférases a lieu ensuite. Ceci aboutit à la production de la très large variété de flavonoïdes connus.

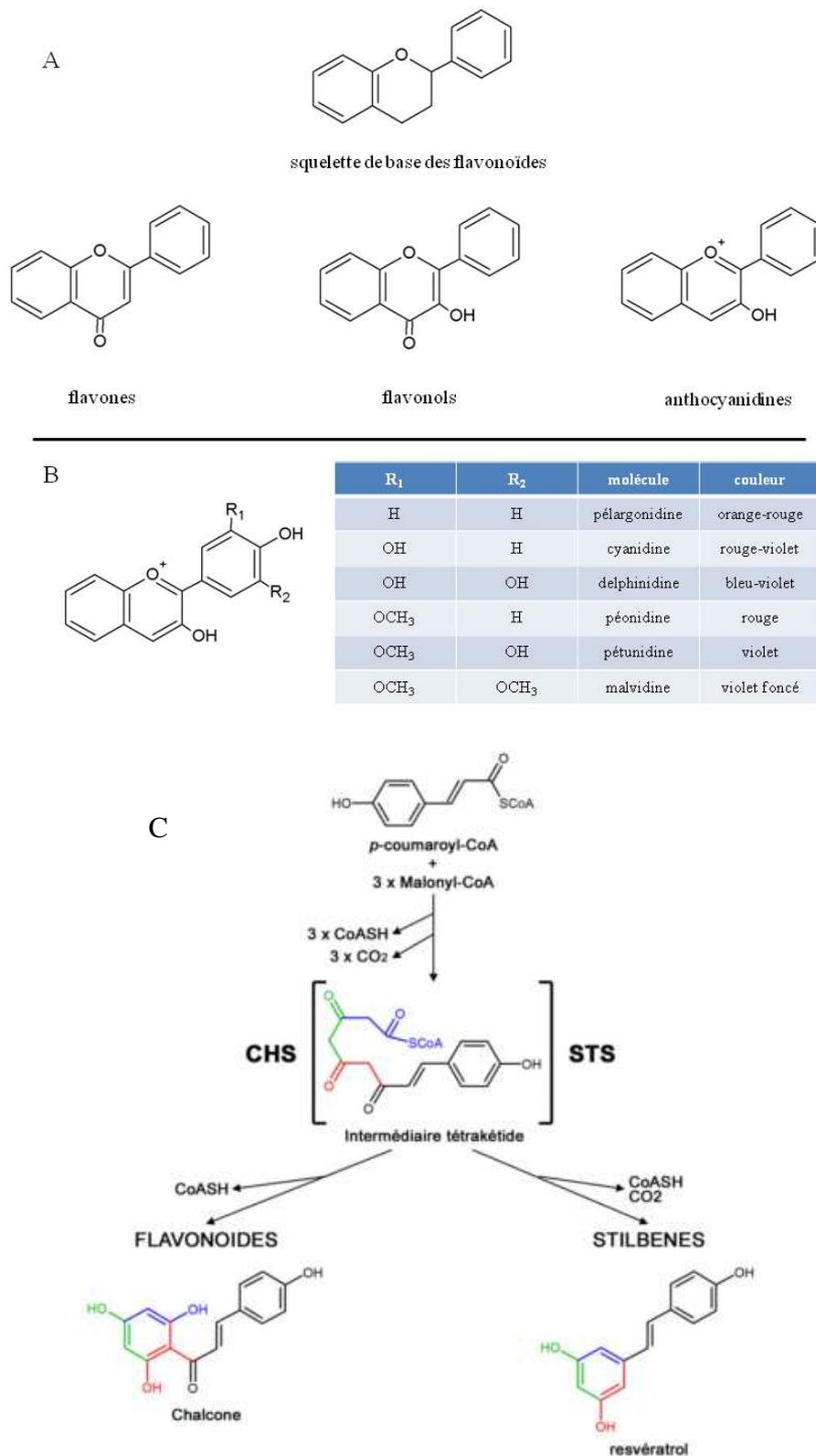


Figure i.11: Structures chimiques des trois classes principales de flavonoïdes (A), représentation des 6 anthocyanidines les plus communes (B) et synthèse des flavonoïdes (d'après Grienenberger, 2010) (comparaison avec la synthèse des stilbènes) (C). CHS : chalcone synthase, STS : stilbène synthase.

Les anthocyanes (anthocyanidines glycosylés) sont les flavonoïdes les plus colorés. Les structures des six anthocyanidines les plus connues sont présentées dans la figure i.11 - B. Elles diffèrent par la distribution des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le noyau central du squelette flavone, ce qui détermine leur coloration. De manière générale, l'hydroxylation augmente la coloration bleue des pigments, tandis que l'addition de groupements méthoxyles augmente la teinte rouge. L'aglycone libre est rarement rencontrée dans la nature, les hétérosides sont plus fréquents.

Une modification fréquente de ces flavonoïdes concerne la liaison possible d'un ou plusieurs acides (malique, p-coumarique, citrique, caféique...) au sucre de l'hétéroside. Le flavonoïde est dit acylé. Ceci augmente beaucoup sa stabilité et modifie ses propriétés physico-chimiques. L'acylation est parfois réalisée artificiellement dans le cas d'exploitation humaine de ces flavonoïdes afin de faciliter leurs applications pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (figure i.12) (Salem *et al.*, 2010).

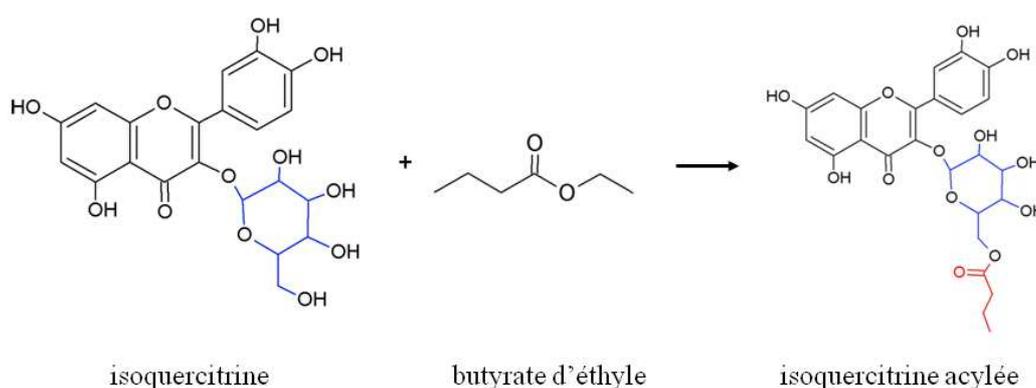


Figure i.12 : Réaction d'acylation de l'isoquercitrine par le butyrate d'éthyle. La réaction est catalysée par une lipase CAL-B (lipase B de *Candida antarctica*). Le sucre est représenté en bleu. (Salem *et al.*, 2010)

2.1.1.4. Les stilbènes

Les stilbènes ont une structure en C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques reliés par un pont éthylène. Il existe deux formes isomériques : la forme *cis* (Z) qui est obtenue par photoisomérisation ou par action de la chaleur et la forme *trans* (E) qui est la forme la plus stable et bioactive (Mérillon *et al.*, 1997). Cette dernière est, en général, la plus abondante dans les différentes espèces végétales productrices de stilbènes (Hart, 1981). L'unité de base des stilbènes est le (E)-3,5,4'-hydroxystilbène

ou (*E*)-resvératrol (figure i.13 - A). Les dérivés du resvératrol varient en fonction du nombre de groupements hydroxyles, des substitutions par les sucres, des groupements méthoxy, par la conformation (*Z*) ou (*E*) et par le degré d'oligomérisation (figure i.13 - B).

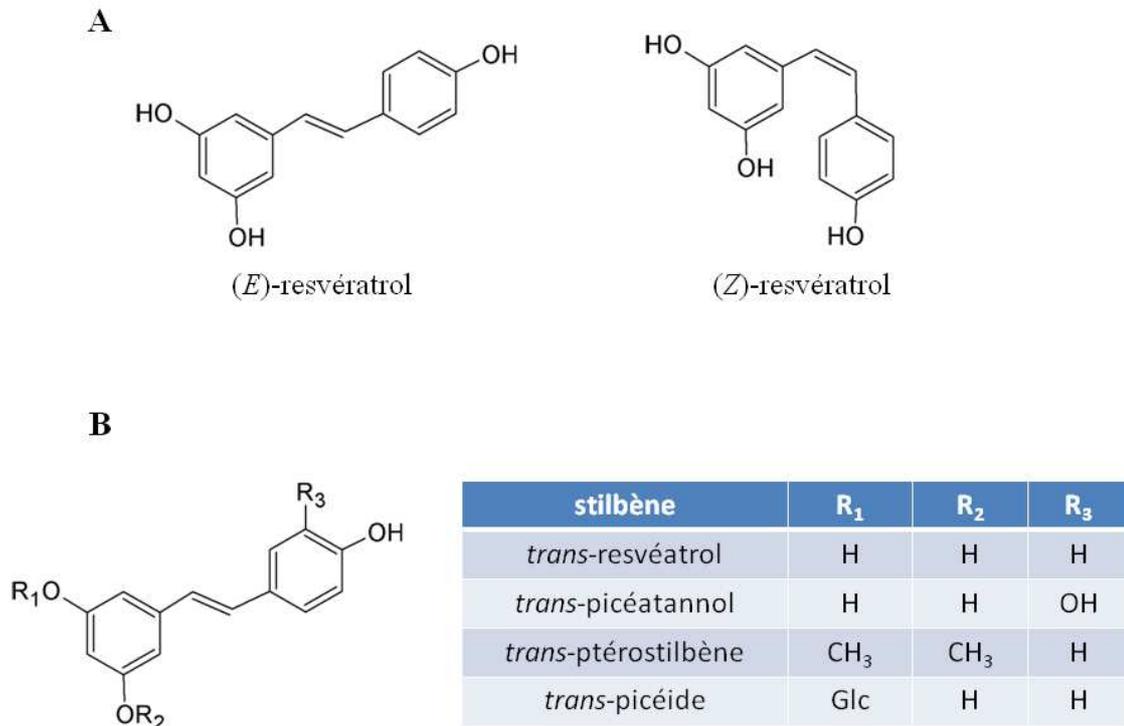


Figure i.13 : Structures chimiques des (*E*)- et (*Z*)-resvératrols (A) et exemples de structure de cinq stilbènes (B).

Les stilbènes dérivent de la voie des phénylpropanoïdes (Donnez *et al.*, 2009) et leur synthèse est initiée par une enzyme caractéristique des plantes productrices de stilbènes : la stilbène synthase (STS) (Chong *et al.*, 2009) (figure i.14). La STS permet la synthèse de resvératrol ou de pinosylvine à partir de trois molécules de malonyl-CoA et d'un dérivé ester-CoA d'acide hydroxycinnamique : le *p*-coumaroyl-CoA dans le cas du resvératrol, et le *p*-cinnamoyl-CoA dans le cas de a pinosylvine (Jeandet *et al.*, 2002). Après la condensation de ces molécules, il se forme alors un polycétide intermédiaire qui sera par la suite cyclisé, étape qui est accompagnée d'une décarboxylation (Tropf *et al.*, 1994). Les STS produisent les stilbènes à partir du *p*-coumaroyl-CoA chez les Angiospermes, comme par exemple la vigne ou l'arachide, et à partir du cinnamoyl-CoA chez les Pinophytes, et plus particulièrement chez le genre *Pinus* (Chong *et al.*, 2009).

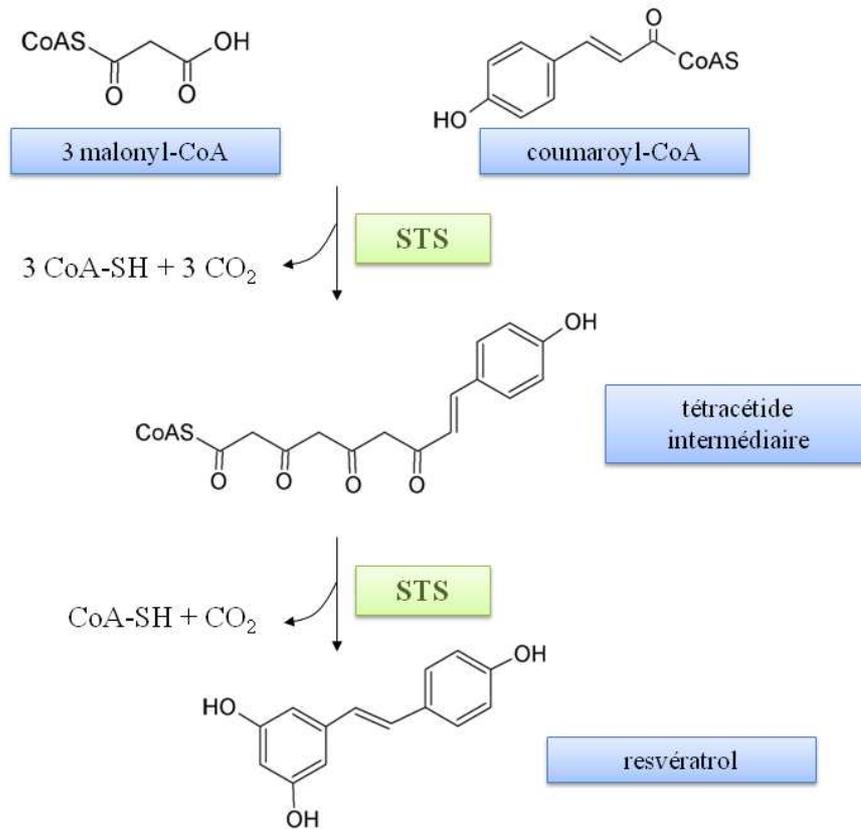


Figure i.14 : Biosynthèse du resvératrol par la stilbène synthase (STS)

Les stilbènes ont une large potentialité de propriétés biologiques de par leur grande variabilité chimique. Certains peuvent avoir un impact bénéfique sur la santé humaine : chémopréventifs, neuroprotecteurs... Le resvératrol, représentant le plus célèbre des stilbènes, a été découvert en 1939 au Japon chez *Veratrum grandiflorum* (Takaoka, 1939). Il est capable de piéger les radicaux libres (Martinez et Moreno, 2000 ; Losa, 2003) et d'activer les enzymes antioxydantes (Losa, 2003 ; Jang *et al.*, 1997). Ce même composé ainsi que ses dérivés pourraient être une parade à la maladie d'Alzheimer en limitant ses effets (Feng *et al.*, 2009). De plus, des travaux montrent l'intérêt de la valorisation du (*E*)-resvératrol dans le traitement des cancers car cette molécule inhibe la prolifération de cellules tumorales (Mgbonyebi *et al.*, 1998 ; Elattar et Virgi, 1999). Enfin, les stilbènes, et particulièrement le resvératrol, ont un effet préventif sur l'agrégation des plaquettes sanguines pouvant être à l'origine d'infarctus du myocarde (Bertelli *et al.*, 2009).

2.1.2 Les formes complexes

Ces composés résultent de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées. Selon la nature des constituants impliqués et selon le type de condensation, les composés peuvent encore présenter une hydrosolubilité suffisante pour être présents dans la vacuole (tanins...) ou au contraire acquérir un caractère lipophile marqué et s'accumuler alors dans les structures pariétales (lignine, formes présentes dans la subérine ou la cutine...).

Dans tous les cas, les formes condensées sont particulièrement difficiles à étudier et, dans la plupart des cas, la dégradation chimique ou enzymatique est indispensable avant de pouvoir les analyser.

2.1.2.1. Les tanins

Les tanins sont des formes phénoliques complexes capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter. On peut distinguer deux grands groupes différant à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

Les tanins hydrolysables sont abondants chez les Eudicotylédones. La structure de base de ces composés est constituée d'un glucide, habituellement le glucose, dont un radical hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide gallique (figure i.15 - A). Les résidus d'acide gallique se lient entre eux pour former un grand polymère réticulé (figure i.15 - B). Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique et libèrent alors, en plus d'une partie glucosidique, une partie phénolique qui peut être soit l'acide gallique soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (figure i.15 - C).

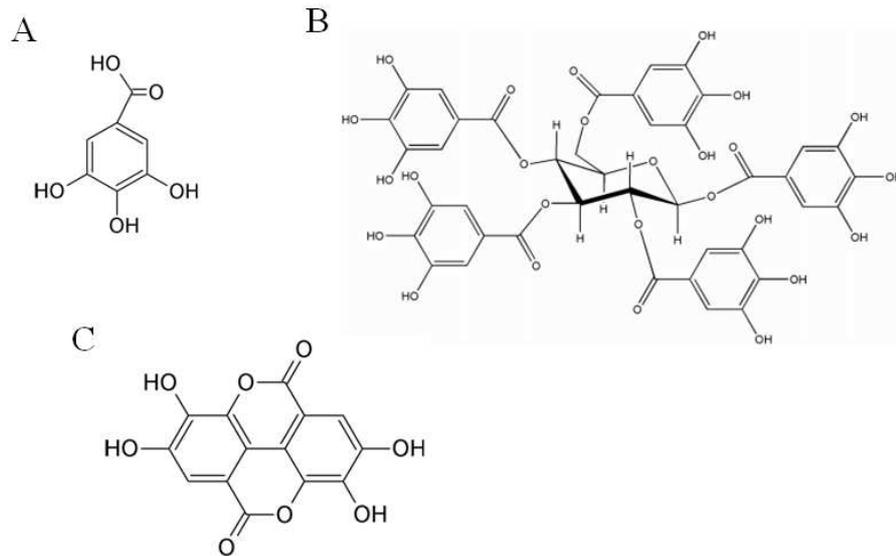


Figure i.15 : Structures chimiques de l'acide gallique (A), d'un tanin hydrolysable, le pentagalloylglucose (polymère formé d'un glucose et de 5 unités d'acide gallique) (B) et de l'acide ellagique (C).

Les tanins condensés sont des oligomères ou polymères de dérivés de la catéchine (flavonoïde) ou de ses nombreux isomères. Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. L'enchaînement des différentes unités constitutives se fait soit de manière linéaire grâce à des liaisons C-C soit par des ramifications grâce à des liaisons C-O-C conduisant à des structures plus complexes qui restent cependant solubles dans l'eau des vacuoles (figure i.16). Les tanins condensés sont abondants dans certains organes végétaux consommés par l'Homme comme de nombreux fruits (pomme, prune, fraise...) ou boissons fermentées ou non (thé, vin, cidre...).

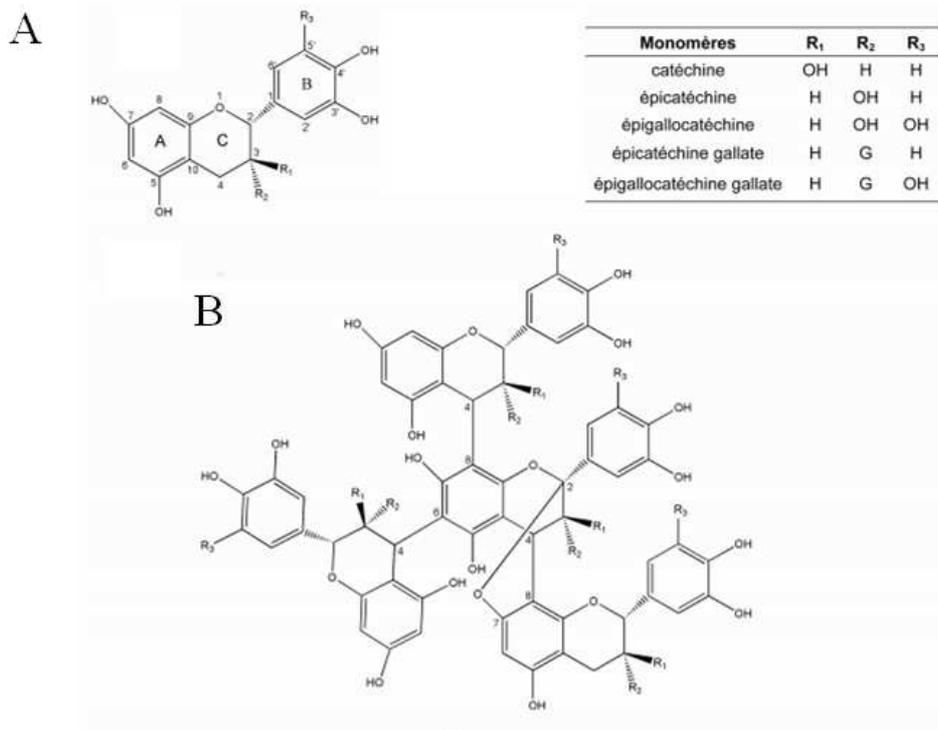


Figure i.16 : Structures chimiques des monomères de flavonols (A) et exemple de tétramère comportant les deux types de liaisons interflavaniques, de type C-C et de type C-O-C (B).

Thèse F. Canon, 2010.

La présence des tanins semble dissuader les animaux de consommer les aliments lorsqu'ils en contiennent. Cet effet pourrait être en relation avec leur astringence, une sensation gustative désagréable qui est une de leur caractéristique. De plus, les tanins sont réputés comme anti-digestif. Quelques tanins peuvent réagir avec des protéines salivaires pour former des complexes difficilement absorbables et donc plus difficile à digérer. Cela a pu être montré chez des primates qui sélectionnaient des lots de fruits de *Lophocebus ugandae* selon leur teneur en tanins (Masette *et al.*, 2015)

Pour l'Homme, les tanins jouent un rôle particulièrement important en œnologie pour la qualité et les caractéristiques organoleptiques des vins (couleur, saveur, astringence et amertume). Leur réactivité est à l'origine de l'évolution constante de leurs structures au cours de la maturation du raisin, de la vinification et du vieillissement des crus.

2.1.2.2. Les lignines

Les lignines sont qualifiées de composés phénoliques en raison de leur structure chimique et de l'origine biosynthétique de leurs précurseurs. Elles résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois molécules phénoliques de base dénommées monolignols. Il s'agit des alcools coumaryliques, coniféryliques et sinapyliques dérivant respectivement des acides *p*-coumarique, férulique et sinapique (figure i.17). Dans le polymère lui-même, les monolignols incorporés sont alors désignés sous le nom d'unités dites H (dérivées de l'alcool *p*-coumarylique), G (dérivées de l'alcool coniférylique) et S (dérivées de l'alcool sinapylique). Ce sont ces unités qui peuvent être quantifiées après dégradation de la lignine.

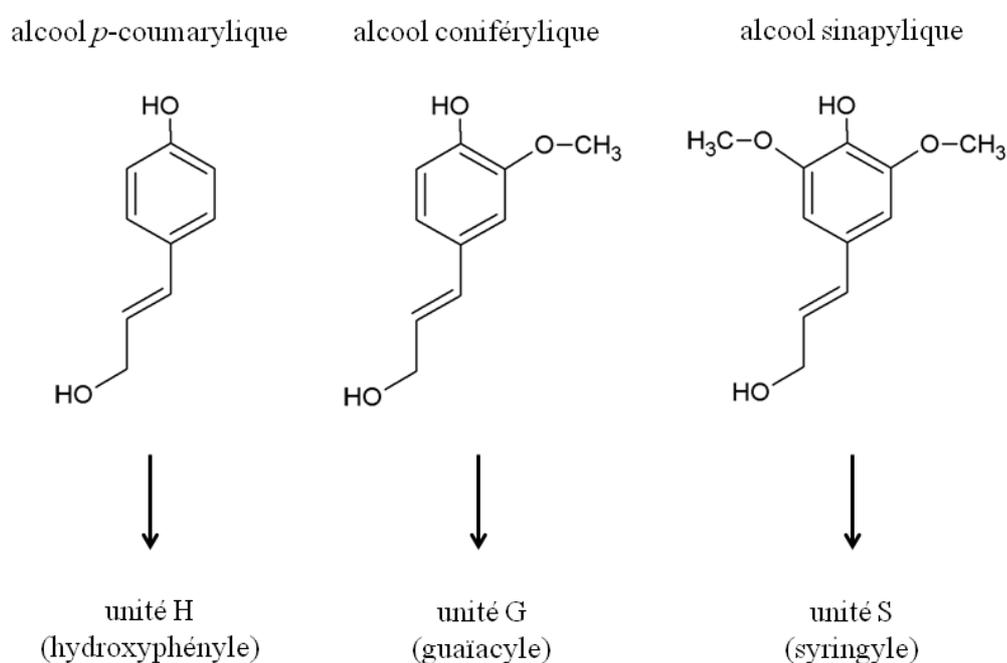


Figure i.17 : Structures chimiques des principaux monomères constituant la lignine. Des liaisons se forment le plus souvent entre le cycle alcool et les atomes de carbone reliés par des doubles liaisons.

Malgré une homogénéité d'ensemble conférant à toutes les lignines des propriétés caractéristiques, il existe une forte variabilité qui porte principalement sur trois points :

- la fréquence des trois monomères dans le polymère final. Elle varie selon l'espèce végétale, la nature des tissus concernés, l'âge de ces tissus, la fraction pariétale étudiée ou encore l'action de certains facteurs externes ou endogènes (lumière, phytohormones...). La lignine

des Gymnospermes est presque exclusivement constituée d'unités G tandis que celle des Angiospermes Eudicotylédones est constituée majoritairement des unités G et S. Chez les Angiospermes Monocotylédones, les 3 unités, G, H et S sont représentées en quantités équivalentes.

- l'hétérogénéité des liaisons entre les différents monomères. Il existe différents types de liaisons. D'une part, celles de type C-O-C entre l'un des carbones du cycle aromatique d'un monomère et celui d'une chaîne latérale d'un monomère voisin. Ces liaisons sont assez facilement dégradables et assemblent des unités que l'on qualifie alors de non condensées. D'autre part, il existe de nombreuses autres liaisons, souvent de type C-C qui sont beaucoup plus difficiles à dégrader et qui forment des unités dites condensées. La proportion de ces types de liaisons est variable selon la nature du bois et le type d'organe végétal.
- l'hétérogénéité due à une hétéropolymérisation, c'est-à-dire l'incorporation, au cours ou après la polymérisation oxydative des 3 monolignols de base, de molécules différentes : acides hydroxycinnamiques, aldéhydes phénoliques, sucres simples ou polyosides... Des nouvelles possibilités de liaisons sont réalisables et il en résulte une augmentation de la résistance mécanique de la paroi.

La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs du xylème, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées. La lignine est un très grand polymère ramifié, insoluble dans l'eau (forte hydrophobicité) et dans la plupart des solvants organiques. Bien que la fonction de la lignine soit d'ordre structurel avant tout, elle a également été considérée comme agent chimique intervenant dans la défense des plantes. La lignine n'est pas facilement digérée par les herbivores et comme elle est liée de façon covalente à la cellulose et aux hémicelluloses, sa présence rend ces composés moins digestibles. Aussi, quand des champignons pathogènes entrent dans une cellule hôte, ils doivent dégrader sa paroi par une digestion enzymatique. Des études ont montré que de la lignine et d'autres composés phénoliques s'accumulent là où le champignon pénètre, ralentissant sans doute la vitesse de dégradation de la paroi (Southerton et Deverall, 1990, Smith *et al.*, 2007).

2.2 Distribution des composés phénoliques dans la plante

En général, les composés phénoliques et les métabolites spécialisés possèdent une répartition très inégale chez les différentes espèces végétales, mais aussi pour une même espèce en fonction de la variété (Innocenti *et al.*, 2005) et du stade développemental de la plante et de ses organes (Sinkovič *et al.*, 2014). Ces variations sont également très fortes selon la nature du tissu végétal (Tugwell et Branck, 1989) et de la cellule (Wink *et al.*, 1997 ; Beckman, 2000).

2.2.1 Répartition aux échelles tissulaire et cellulaire

2.2.1.1. A l'échelle cellulaire

Les modifications chimiques des polyphénols peuvent affecter la solubilité des molécules dans l'eau et influencent largement leur répartition dans la cellule végétale. Cependant, il existe deux localisations principales :

- la vacuole où sont présents tous les composés ayant un caractère hydrophile plus ou moins marqué, c'est-à-dire la plupart des formes simples et certaines formes polymérisées comme les tanins.
- la paroi qui renferme la lignine et les différentes formes liées aux structures lipidiques (subérine, cutine).

D'autres compartiments cytoplasmiques (réticulum endoplasmique, chloroplaste, vésicules golgiennes...) participent à la biosynthèse des phénols dans la cellule mais ne sont généralement pas des zones importantes d'accumulation (Macheix *et al.*, 2005).

2.2.1.2. A l'échelle tissulaire

La localisation tissulaire des composés phénoliques est également très hétérogène. Celle-ci est le plus souvent à mettre en relation avec une fonction physiologique particulière. Par exemple, dans la pomme rouge mature, les anthocyanes sont uniquement présentes dans l'épiderme du fruit et leur accumulation est contrôlée par des facteurs externes tels que la température (Saure, 1990). Bien que la répartition caractéristique des composés phénoliques dans la plante puisse être modulée par les

facteurs de l'environnement, elle résulte principalement du programme de différenciation et de développement du végétal.

2.2.2 Variations au cours de la vie de la plante

Les variations qualitatives et quantitatives des composés phénoliques peuvent être particulièrement marquées au cours de la vie de la plante. Les teneurs en composés phénoliques peuvent être élevées dans les organes jeunes et diminuer ensuite au cours de la croissance ou à l'opposé, certains organes montrent de fortes concentrations en polyphénols au stade adulte ou lors de la sénescence. Par exemple, des tanins sont accumulés dans les feuilles adultes de chêne, les rendant alors peu appréciés par les insectes (Feeny and Bostock, 1968). Chez la chicorée, des différences en contenus polyphénoliques totaux ont été mesurées entre les feuilles internes et externes insérées sur le pivot racinaire, de façon variable selon la variété. Dans ce cas, la position foliaire est un facteur de variation concernant le contenu en composés phénoliques (Sinkovič *et al.*, 2014).

Bien qu'étant sous le contrôle des facteurs externes, l'accumulation des composés phénoliques à des phases précises de la vie du végétal et dans des organes spécifiques est principalement le résultat de l'expression programmée du génome. Certains polyphénols peuvent alors s'avérer être de bons marqueurs de stades physiologiques.

2.2.3 Variations intraspécifiques

A l'intérieur d'une espèce végétale déterminée, les différentes variétés peuvent présenter des compositions en molécules phénoliques caractéristiques de chacune d'entre elles. Cela est particulièrement apparent pour les anthocyanes et autres flavonoïdes dont la présence ou l'absence est caractéristique des multiples variétés florales (chez les roses, azalées...) et fruitières (pommes, raisins...) (figure i.18 - A). Chez la chicorée, il existe une variabilité entre différentes variétés de l'espèce *intybus* (Carazzone *et al.*, 2013). Cette variabilité est visible par la couleur des feuilles, par exemple entre les variétés 'Treviso' et 'Grumolo' (figure i.18 - B).

A

'Alba'



'Rubra'



'Thumbergiana'

B

'Grumolo'



'Treviso'



Figure i.18 : Photographies de la fleur de différentes variétés de *Rosa rugosa* (A) et des variétés 'Treviso' et 'Grumolo' de *Cichorium intybus* (B).

2.3 Rôle des composés phénoliques pour la plante

L'importance des composés phénoliques est de plus en plus mise en avant et décrite dans la littérature scientifique. Ceux-ci ont notamment un rôle capital pour la plante en elle-même : dans le processus de germination, dans le contrôle de la toxicité induite par les ROS (espèces réactives de l'oxygène) mais aussi dans le port et la croissance du végétal avec le cas particulier de la lignine. De plus, les polyphénols jouent un rôle loin d'être négligeable dans les relations du végétal avec son environnement : pollinisation, protection contre les pathogènes...

2.3.1 Rôles physiologiques des composés phénoliques

2.3.1.1. Impact des composés phénoliques sur la germination

De nombreux composés phénoliques sont inhibiteurs de germination soit dans les conditions naturelles où ils participent alors aux relations allélopathiques entre les végétaux, soit lorsqu'ils sont apportés de manière exogène dans le milieu expérimental (Reigosa *et al.*, 1999). Les téguments des graines matures sont généralement riches en composés phénoliques qui leur confèrent une couleur brune lorsqu'ils sont oxydés (Vasconcelos *et al.*, 2010). C'est aussi le cas des fruit charnus comme la pomme dont le péricarpe en est riche (Tsao *et al.*, 2005). L'un des rôles de cette accumulation serait d'inhiber la germination des graines dans le péricarpe du fruit (Varga et Köves, 1959). C'est le cas, notamment chez le châtaigner chinois (*Castanea mollissima*) dont la germination des graines est inhibée par l'acide *p*-coumarique, contenu dans la *testa* (Liu *et al.*, 2012). Dans certains cas, un mécanisme relativement simple peut être proposé pour comprendre l'action des polyphénols tégumentaires : ces composés priveraient l'embryon d'un apport convenable d'oxygène en le piégeant au passage en raison de leur propre oxydation (Macheix *et al.*, 2005).

Par ailleurs, dans les conditions naturelles, les graines tombées au sol sont souvent en contact avec des composés phénoliques simples provenant du lessivage des litières et des humus riches en produits de dégradation de la lignine et en acides humiques. De nombreux composés phénoliques (provenant d'espèces végétales différentes) sont donc présents dans les litières à des concentrations qui évoluent dans le temps avec les transformations chimiques de la matière végétale et les lessivages naturels du sol (Hättenschwiler et Vitousek, 2000). La germination peut être inhibée à une période déterminée (par exemple en automne après libération de la matière végétale sur le sol) alors

qu'elle devient possible après quelques semaines ou mois. Cela permet un étalement de la germination dans le temps, sachant que la réponse reste différente selon les espèces.

Les inhibitions de germination observées dépendent d'une part de la nature et de la concentration des composés testés et d'autre part de la graine considérée, en particulier de l'épaisseur de son tégument et de sa perméabilité à l'oxygène et aux substances dissoutes dans l'eau de germination. La germination est généralement améliorée lorsque la teneur en phénols des graines diminue soit au cours de l'évolution naturelle soit à la suite de traitements appliqués aux graines. C'est le cas, par exemple de la germination des graines de *Picea* (Pellisier, 1994). Celle-ci est inhibée par les composés phénoliques présents dans l'humus des sols.

2.3.1.2. Importance dans la détoxification des formes actives de l'oxygène

Les ROS (espèces réactives de l'oxygène) dérivent de l'oxygène et présente une forte toxicité pour la plante (figure i.19). Les stress oxydatifs, dont la génération accrue de ces ROS est caractéristique, sont induits par un large spectre de facteurs environnementaux : UV, pathogènes...

espèces réactives de l'oxygène
anion superoxide O_2^-
oxygène singulet 1O_2
ion hypochlorite OCl^-
peroxyde d'hydrogène H_2O_2
ion hydroxyle OH^-
radical hydroxyle OH^\bullet

Figure i.19 : Les principales espèces réactives de l'oxygène (d'après Turrens, 2003)

Au cours de l'évolution sont apparus, chez les espèces vivant en présence d'air enrichi en oxygène, des mécanismes permettant de maintenir l'homéostasie des concentrations en ROS (Gardès-Albert *et al.*, 2003). Ces mécanismes impliquent une panoplie de molécules antioxydantes et d'enzymes réparatrices. Les composés phénoliques interviennent dans ces défenses antioxydantes en neutralisant les radicaux libres formés à la suite d'un stress ou de ceux issus du métabolisme normal (Blokhina *et al.*, 2003). A ce titre, ils participent *in vivo* au maintien de l'équilibre redox de la cellule et

protègent les structures cellulaires sensibles, en évitant en particulier la peroxydation des lipides (membranaires ou de réserve) et des autres structures chimiques sensibles dont l'ADN, les protéines et la chlorophylle (Feng *et al.*, 2002). Cette dernière pourrait être protégée par les anthocyanes qui apparaissent à l'automne dans les feuilles sénescents et qui absorbent fortement la lumière bleue. La dégradation retardée de la chlorophylle limite la formation d'oxygène singulet dans les feuilles sénescents et permettrait une meilleure ré-utilisation des protéines chloroplastiques qui sont alors transportées vers les parties pérennes du végétal (Feild *et al.*, 2001).

Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques sont liées à leur haute réactivité en tant que donneurs d'hydrogènes et d'électrons et pour leur capacité à stabiliser et délocaliser les électrons non appariés (Blokhina *et al.*, 2003). La capacité des polyphénols à céder un électron permet également de rétablir le potentiel antioxydant des vitamines A, E et C (Tabet *et al.*, 2002). On attribue aussi aux antioxydants la capacité de piéger les ions métalliques comme le fer, le cuivre, le zinc et le magnésium (Wijeratne *et al.*, 2005). Ces métaux sont responsables de la production de radicaux hydroxyles très réactifs, aboutissant à des réactions d'oxydation en chaîne (réaction de Fenton ou d'Haber-Weiss) (Halliwell, 1978 ; McCord et Day, 1978). La chélation de ces métaux par les composés polyphénoliques se ferait alors par une complexion structure-dépendante entre les deux molécules (Acker *et al.*, 1996).

2.3.1.3. Rôle de soutien : cas de la lignine

La lignine assure en plus de son rôle dans le transport à longue distance de l'eau, un rôle de soutien. Elle est initialement produite et accumulée aux angles des cellules puis gagne la lamelle moyenne et les différentes autres couches pariétales, des plus anciennement formées aux plus récentes. La lignine est intégrée entre les microfibrilles de cellulose, au niveau de la matrice d'hémicelluloses où elle se substitue à l'eau, ce qui augmente considérablement le caractère hydrophobe de la paroi et la rend imperméable, en plus de la faire gagner en rigidité (figure i.20) (Baucher *et al.*, 1998). La sève brute s'écoule alors facilement dans le xylème.

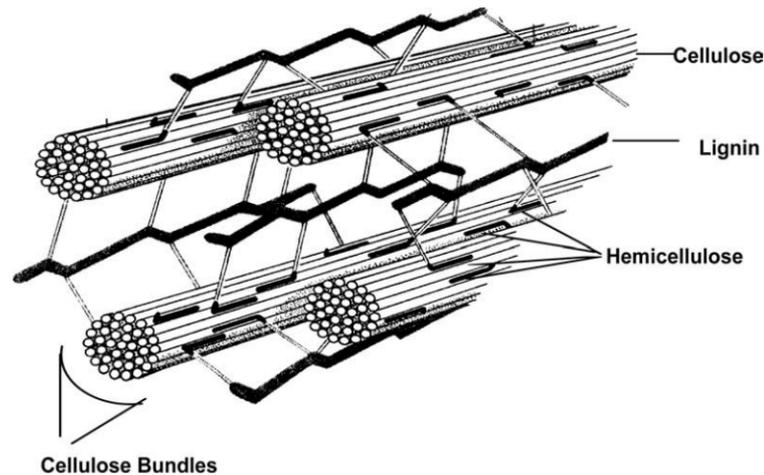


Figure i.20 : Structure de la paroi des végétaux (Murphy et Mc Carthy, 2005)

2.3.2 Rôles dans les interactions plante-environnement

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement, soit en jouant le rôle de signaux de reconnaissance vis-à-vis de certains micro-organismes, soit en lui permettant de résister à diverses agressions, d'origine biologique ou non (Dixon et Paiva, 1995). Ces métabolites spécialisés, qu'ils soient constitutifs ou qu'ils s'accumulent à la suite de différents stress, jouent un rôle essentiel dans l'équilibre de la plante au sein de son milieu naturel et dans ses capacités d'adaptation (Lynn *et al.*, 1990).

2.3.2.1. Mise en place de symbioses

Le terme symbiose désigne les relations écologiques à bénéfice réciproque qu'entretiennent des organismes d'espèces différentes vivant en contact direct. Plusieurs fixations symbiotiques fixatrices d'azote sont connues, elles englobent les associations entre légumineuses et des bactéries du genre *Rhizobium*, entre des *Ericaceae*, *Myriaceae* et d'autres bactéries du genre *Frankia*, etc... De telles relations symbiotiques permettent à la plante d'avoir accès à l'azote provenant de la réduction de l'azote atmosphérique par l'activité bactérienne, ce qui est impossible pour les plantes supérieures (Rhijn et Vanderleyden, 1995). Dans le cas de l'interaction légumineuses – *Rhizobium*, les composés phénoliques interviennent dans la mise en place de l'interaction plante/bactérie et représente un

premier niveau de spécificité entre légumineuses et d'autres espèces ou lignées bactériennes. La symbiose se met en place lorsque la bactérie sécrète des facteurs de nodulation qui vont être reconnus par la plante. Cependant, la plupart des gènes bactériens ne sont pas transcrits tant qu'ils n'ont pas été activés par l'action conjointe d'une protéine, appelée NodD, produite de manière constitutive par la bactérie, et de composés phénoliques (généralement des flavonoïdes) exsudés dans la rhizosphère par les racines de la plante (Long, 2001).

En plus de cet effet initiateur et sélectif, les composés phénoliques semblent jouer dans certains cas un double rôle : d'une part pour limiter l'extension bactérienne et peut-être éviter une dérive vers une relation de parasitisme et, d'autre part, pour créer une compartimentation fonctionnelle à l'intérieur même du nodule dans le cas des symbioses fixatrices d'azote (Laplaze *et al.*, 1999).

2.3.2.2. *Protection contre les agressions de parasites*

L'implication des composés phénoliques dans la résistance des végétaux aux agents pathogènes recouvre trois aspects complémentaires qui dépendent de la préexistence ou non des composés impliqués dans la défense de la plante contre les agressions :

- l'existence de barrières phénoliques constitutives, préexistant à l'infection et qui peuvent en limiter les effets (lignine,...) ;
- la stimulation de la biosynthèse de polyphénols déjà présents dans la plante avant l'infection mais biologiquement inactifs : les phytoanticipines. Cette activation s'effectue grâce à la libération d'enzymes de la plante lors de la rupture de l'intégrité de la cellule (Mansfield, 1983) ;
- la biosynthèse de phytoalexines inexistantes dans la plante avant l'infection et qui résulte donc d'une nouvelle expression de gènes du métabolisme spécialisé à la suite de l'interaction entre les deux partenaires.

La distinction entre phytoanticipines et phytoalexines n'est pas toujours évidente et un même composé pourra être une phytoanticipine chez une espèce et une phytoalexine chez une autre (Dixon, 2001). Par exemple, la sakuranétine, une flavanone méthylée, est accumulée de manière constitutive dans les glandes sur la surface adaxiale des feuilles de cassis, mais est un composé inductible antimicrobien majeur dans les feuilles de riz (Atkinson et Blakeman, 1982 ; Kodama *et al.*, 1988).

Les barrières naturelles, préexistantes à l'infection, sont souvent renforcées à la suite de l'agression par un parasite. Ce renforcement résulte alors d'une augmentation de l'expression des gènes codant les enzymes du métabolisme phénolique (Collinge et Slusarenko, 1987). Dans un premier temps, la lignine, composé difficile à dégrader, représente une barrière physique s'opposant aux attaques. Une réponse de la plante à l'infection consiste dans certains cas à augmenter la teneur en lignine pour permettre une meilleure résistance (Macheix *et al.*, 2005).

En parallèle à l'action de ces barrières physiques, des barrières chimiques, constituées de composés phénoliques constitutifs solubles, sont mises en place. On retrouve, par exemple, des tanins qui protègent la plante contre les herbivores et les agents pathogènes (Harborne, 1995). Ils présentent une grande toxicité vis-à-vis des micro-organismes. De nombreux composés phénoliques simples (acides caféique, férulique, chlorogénique...) possèdent une activité antibactérienne et antifongique soit dans leur état normal, soit après avoir été oxydés en quinones par les enzymes de la plante ou du micro-organisme (Bennett et Wallsgrave, 1994). Par exemple, une étude a montré que du tabac transformé, contenant des teneurs très faibles en acides chlorogéniques, résistait beaucoup moins aux attaques fongiques (Maher *et al.*, 1994). Plus récemment, la sur-expression d'une enzyme impliquée dans la synthèse d'acide chlorogénique a engendré une accumulation accrue de ce composé chez la tomate. Il a été remarqué, par la même occasion, que la résistance de la plante face aux agressions bactériennes était améliorée (figure i.21) (Niggeweg, *et al.*, 2004). Ces composés peuvent avoir une action directe en bloquant la croissance du micro-organisme, ou avoir une action indirecte en inhibant certaines enzymes que le micro-organisme utilise pour pénétrer dans la plante. L'effet initial lié aux polyphénols pré-existants à l'infection est très fréquemment renforcé par une forte augmentation de leurs teneurs après l'infection (Modafar *et al.*, 1996). La teneur initiale élevée en composés phénoliques et/ou leur augmentation plus intense et plus rapide permettent souvent de différencier les espèces (ou les cultivars) résistantes à un parasite par rapport à ceux qui y sont sensibles (Dai *et al.*, 1995). Les composés phénoliques peuvent être également actifs à une certaine distance de la plante. Les composés sont disséminés soit à la suite du lessivage naturel des litières végétales, soit parce qu'ils sont présents dans la rhizosphère à la suite de l'exsudation racinaire. Mais, certains micro-organismes, en particulier les champignons, peuvent dégrader les composés phénoliques qui leur servent alors de substrats carbonés et favorisent ainsi leur croissance (Thormann *et al.*, 2002). Cependant, ce constat ne semble pas avoir été prouvé *in situ*.

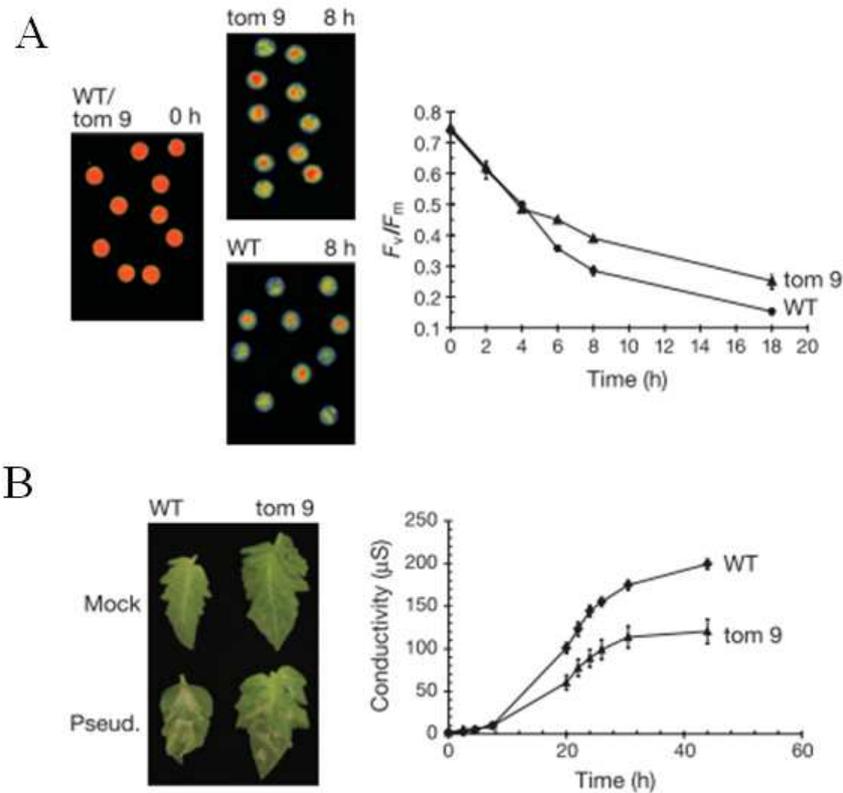


Figure i.21 : Des teneurs accrues en acide chlorogénique améliorent la tolérance de la plante au stress oxydatif et à l'infection bactérienne (Niggeweg *et al.*, 2004). Une enzyme (HQT) impliquée dans la synthèse d'acide chlorogénique a été sur-exprimée chez le tomate (tom 9)

- (A) **stress oxydatif** : incubation de disques foliaires de plants de tomate sauvages (WT) et transformés (tom 9) dans une solution de paraquat (pesticide) et traitement lumineux ($350 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Le Paraquat est un produit oxydant puissant. La fluorescence de la chlorophylle a été étudiée pour estimer l'efficacité photosynthétique et l'intensité du stress oxydatif. Les dommages oxydants sont visualisés par une diminution de la fluorescence par rapport au témoin.
- (B) **infection bactérienne** : infiltration des feuilles avec une suspension de *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 ou avec du tampon (Mock). Photographie des symptômes foliaires et mesure de la conductivité électrique des disques comme marqueurs de la sévérité de l'infection.

La résistance des végétaux à différents agents pathogènes passe généralement par un phénomène de reconnaissance précoce entre les deux protagonistes. C'est l'élicitation ; elle résulte alors de la production de molécules organiques (éliciteurs) par le micro-organisme (oligosaccharides, petites protéines...) ou issues de la paroi végétale à la suite de l'interaction avec l'agent pathogène. Le résultat final de l'élicitation va être une réaction d'incompatibilité caractérisée par l'activation des mécanismes de défense de la plante, en particulier de l'expression des gènes du métabolisme

phénolique. Cela concerne des voies déjà fonctionnelles dans la plante (polyphénols constitutifs) ou des voies inactives avant l'élicitation. Dans ce deuxième cas, des phytoalexines sont ainsi produites (Dixon et Paiva., 1995). Les phytoalexines sont des composés qui appartiennent à des groupes chimiques variés mais dont un bon nombre sont de nature phénolique (Bennett et Wallsgrave, 1994). Ils sont de faibles poids moléculaires et présentent une activité anti-microbienne nette. Les composés phénoliques néoformés s'accumulent dans les cellules voisines de l'infection initiale où ils constituent alors une barrière chimique qui va bloquer ou au moins ralentir la progression du micro-organisme (Choi *et al.*, 2005). La nature des phytoalexines produites par une plante est généralement caractéristique de l'espèce végétale considérée, indépendamment de l'agent pathogène inducteur.

Pour réagir face à une attaque d'agresseurs herbivores, la plante peut user également des composés volatils dont des polyphénols pour attirer des parasitoïdes. Chez le blé, par exemple, le sulcatol et le sulcatone sont émis en réponse à des attaques de pucerons. Ces molécules ont la propriété d'attirer les parasitoïdes femelles *Aphidius avenae* Haliday (*Hymenoptera: Aphidiidae*), prédateurs des pucerons (Liu *et al.*, 2009).

2.3.2.3. Protection de la plante contre les rayonnements ultraviolets

Le spectre solaire est riche en UV-B (280-315 nm) néfastes pour les êtres vivants. La plupart des composés phénoliques absorbent dans cette plage de longueurs d'onde, et en étant présents dans les cellules les plus externes des feuilles, ils réduisent la pénétration des UVs au niveau du mésophylle. Ils jouent donc le rôle de filtres UV et protègent les structures végétales sensibles (ADN, pigments photosynthétiques et protéines de photosystèmes chloroplastiques...) (Mazza *et al.*, 2000). Chez *Arabidopsis*, les dérivés des flavonoïdes et des esters d'acide sinapique ont, notamment, une importance dans la résistance de la plante face au rayonnement UV en jouant un rôle de protection. D'ailleurs, les acides hydroxycinnamiques se sont avérés être de meilleurs protecteurs que les flavonoïdes (Landry *et al.*, 1995). Ceux-ci, et en particulier l'acide chlorogénique, absorbent le rayonnement UV et manifestent des propriétés anti-oxydantes qui leur confèrent cet effet protecteur. Sous un stress lumineux, l'activation de la voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique pourrait permettre à la plante de dissiper l'énergie photochimique excédentaire tout en augmentant la capacité anti-oxydante de la plante (Grace et Logan., 2000).

Chez l'artichaut, l'hypothèse de l'implication des acides dicaféoylquiniques dans la protection contre les rayons UV a été émise (Moglia *et al.*, 2008). De même, chez la vigne, l'acide *p*-caféoyltartrique semble jouer ce rôle protecteur contre les UVs (Del-Castillo-Afonso *et al.*, 2014).

2.3.2.4. Atout pour la pollinisation

Les végétaux sont caractérisés par leur incapacité à la mobilité, ce sont des organismes fixés à leur support. La production de composés volatils est alors un moyen de communiquer à distance avec d'autres organismes. Ce langage est loin d'être totalement décrypté d'un point de vue chimique (Pichersky et Gershenzon, 2002). La couleur des fleurs est également un aspect important à prendre en compte dans l'attraction des pollinisateurs. Celle-ci implique les flavonoïdes. Les pollinisateurs auraient même des préférences de couleurs (Barrows, 1976). Il a été remarqué que des changements de couleurs des fleurs de *Pachyptera hymenaea* survenaient de façon associée au processus de pollinisation. La fréquence de visites des fleurs par les insectes varie en fonction de la couleur de ce mêmes fleurs (figure i.22) (Barrows 1977). De la même façon, chez le lantana, la couleur des fleurs change durant les derniers stades de développement de la fleur (figure i.20). Celle-ci passe du jaune au violet après une période de 3 jours environ permettant aux pollinisateurs de choisir les fleurs jaunes toujours fertiles et offrant du nectar. Les fleurs âgées de lantana sont quant à elles préférées par les papillons pour leur stock de pollen (Barrows, 1976). La pigmentation des fleurs, notamment par les anthocyanes, est une caractéristique importante pour l'attraction des insectes ou des oiseaux pollinisateurs. Cependant, d'autres paramètres agissent également sur le choix des pollinisateurs : émission de parfum et nectars, caractéristiques morphologiques du pollen...



Pachyptera hymenaea



Lantana camara

Figure i.22 : Fleurs de *Pachyptera hymenaea* et de *Lantana camara*

2.4 Utilisation des composés phénoliques par l'Homme et importance économique

2.4.1 Qualités sensorielles et nutritionnelles

Les composés phénoliques sont des constituants ayant un rôle important dans la perception sensorielle des produits végétaux. Comme vu précédemment, ils entrent en jeu dans l'aspect visuel des végétaux, dans l'astringence, dans les arômes... Les variations de leurs natures et de leurs teneurs au cours des traitements technologiques peuvent engendrer des problématiques auxquelles sont confrontés les chercheurs dans les domaines de l'agroalimentaire, de la cosmétique, etc. Enfin, la réaction d'oxydation des polyphénols est un mécanisme influant dans l'aspect et la conservation des différents produits alimentaires.

2.4.1.1. L'oxydation alimentaire

La structure chimique des composés phénoliques leur confère une grande capacité d'oxydation et en fait d'excellents antioxydants. Ils peuvent également s'auto-oxyder à l'air ou en présence de métaux comme le fer et de façon très rapide par réaction enzymatique dès que l'intégrité cellulaire des végétaux est perturbée. En effet, certains d'entre eux sont de très bons substrats des enzymes d'oxydation que sont les polyphénol oxydases (PPOs) et les peroxydases (PODs). Les premiers produits formés au cours des réactions d'oxydation sont des quinones qui présentent des couleurs spécifiques dépendant de leur nature chimique. Une des propriétés essentielles des quinones est leur instabilité et leur réactivité : elles se polymérisent très rapidement ou se combinent avec d'autres molécules présentes *in situ* (acides aminés, peptides, protéines...), conduisant alors à la formation de complexes relativement stables dont la couleur brune caractérise le brunissement enzymatique des végétaux (figure i.23) (Nicolas *et al.*, 2009).

A la suite des réactions d'oxydation des composés phénoliques se forment des radicaux libres, espèces instables et nocives pour l'organisme. Le déclenchement de la réaction enzymatique d'oxydation des composés phénoliques nécessite une dé-compartmentation cellulaire préalable car les enzymes et substrats sont localisés dans des compartiments cellulaires différents. Les composés phénoliques se trouvent dans la vacuole alors que la plupart des enzymes d'oxydation sont présentes

dans les plastes ou les parois. Ce processus intervient dans la résistance des plantes aux agents pathogènes, dans la mesure où les quinones qu'elles forment à partir des phénols sont très actives pour bloquer le développement des micro-organismes.

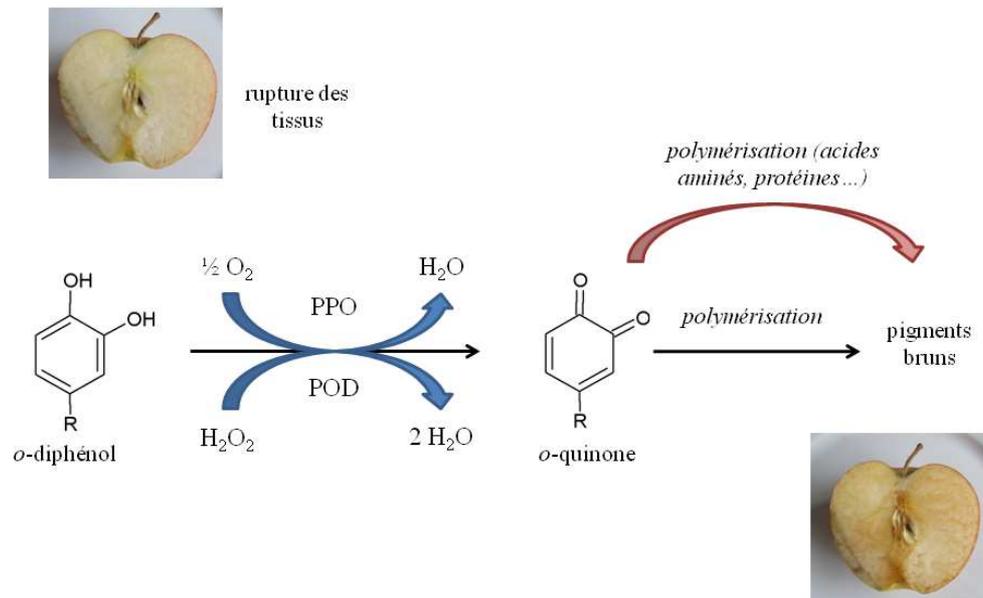


Figure i.23 : Les principales étapes du brunissement depuis l'oxydation enzymatique initiale des composés phénoliques jusqu'à la formation des pigments bruns. PPO : polyphénol oxydase, POD : peroxydase.

Le brunissement d'un fruit ou d'un légume est donc un phénomène courant se manifestant après l'avoir coupé ou fractionné. Il s'accompagne d'une modification des qualités organoleptiques (odeur, goût, aspect) prenant place plus ou moins rapidement. Ce brunissement est parfois souhaitable, car il permet une amélioration du goût de certains produits (thé,...), mais est dans de nombreux cas indésirable, car signe du dépérissement d'un aliment. Tous les organes des plantes utilisés dans l'alimentation, qu'ils soient consommés directement à la récolte ou après conservation et transformation contiennent des composés phénoliques et des enzymes d'oxydation et sont susceptibles de brunir. Les salades et chicons, par exemple, sont sensibles à ce phénomène de brunissement. Cela représente un enjeu important dans les traitements post-récolte. C'est également un problème qui existe chez le trèfle rouge, culture fourragère. Récemment, des recherches ont été effectuées sur la synthèse de l'acide phasélique, composé majeur sensible à l'oxydation chez le trèfle. Une enzyme (hydroxycinnamoyl-CoA : malate hydroxycinnamoyl transférase) impliquée dans sa synthèse a été mise en évidence, ce qui a permis de constater une diminution du brunissement post-récolte après sous-régulation de son expression (Sullivan et Zarnowski, 2011).

Les antioxydants permettent de faire en sorte que nos produits alimentaires conservent leur goût et leur couleur et demeurent longtemps comestibles. Une bonne activité antioxydante permet de retarder les dernières étapes de l'auto-oxydation mais aussi de protéger certains acides aminés et certaines vitamines, facilement détruits s'ils sont exposés à l'air. Ils contribuent également à ralentir la décoloration des fruits et légumes. Enfin, ces antioxydants vont permettre de neutraliser les radicaux libres, annihilant alors leurs effets nocifs. Afin d'élargir la gamme d'antioxydants naturels, couramment utilisés dans l'alimentation (acide ascorbique...), des efforts sont engagés dans la découverte de nouvelles substances végétales dotées de ces propriétés. Malgré tout, jusqu'à présent, cette recherche s'est avérée difficile car les substances naturelles présentent souvent d'autres caractéristiques indésirables (toxicité, goût désagréable...).

L'acide chlorogénique et d'autres dérivés d'acide caféique voisins (acide caféoylshikimique ou tartrique) sont des substrats possibles des PPOs et PODs. Généralement, l'estérification du groupement carboxyle de l'acide caféique par l'acide quinique ou tartrique conduit à une augmentation de l'affinité des polyphénol oxydases pour le substrat phénolique et donc du brunissement qui en résulte (Marquès *et al.*, 2005).

Récemment, une série de cultivars de pommiers génétiquement modifiés contenant un caractère de non-brunissement introduit par biotechnologie ont été obtenus. Il s'agit des pommes dites Arctic. Chez ces végétaux, l'expression d'un gène codant une polyphénol oxydase est inhibée. Ceci empêche le fruit de brunir après coupe ou blessure (figure i.24). L'USDA (United State Department of Agriculture) a autorisé le 13 février 2015 la commercialisation de deux variétés de cette pomme. La demande avait été déposée par l'entreprise québécoise Okanagan. Les obtenteurs de ces variétés vantent les intérêts de ces pommes censées présenter de nombreux avantages pour la chaîne logistique, notamment par la réduction des déchets et rebuts liés au brunissement, les applications de coupe en frais et la commodité pour les consommateurs.

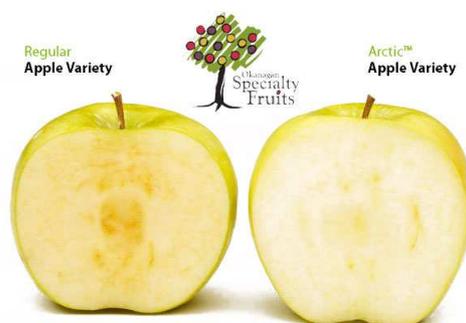


Figure i.24 : Comparaison du brunissement d'une variété de pomme traditionnelle et d'une variété Arctic.

2.4.1.2. Composés phénoliques et flaveur

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans les propriétés sensorielles des végétaux, notamment dans ce que l'on appelle la flaveur. Ce terme regroupe l'ensemble des perceptions gustatives, olfactives et trigéminales (source internet INRA, Sebastián Escalón). La première composante correspondant à la saveur est procurée par les molécules non volatiles présentes dans les aliments. Elle est associée aux qualificatifs suivants : salé, sucré, amer, acide. La deuxième composante de la flaveur est l'arôme. Cette fois, ce sont les composés volatils libérés lors de la mastication et qui remontent vers le système olfactif. La perception de l'arôme est complexe car elle résulte en général de la combinaison de plusieurs molécules. Environ 250 composés sont responsables de l'arôme vanille et parmi ceux-ci une vingtaine de composés phénoliques dont les plus abondants sont la vanilline, le *p*-hydroxybenzaldéhyde et l'acide vanillique (Hartman *et al.*, 1992 ; Fleuriet *et al.*, 1996). Enfin, la troisième composante de la flaveur est l'ensemble des sensations trigéminales. Ces sensations sont celles du piquant, de l'astringence, du chimique, du brûlant... Ce sont des perceptions thermiques, mécaniques et chimiques.

Les épices utilisées afin de rehausser la flaveur des aliments contiennent des composés volatils caractérisés par la présence d'un groupement méthoxylé : les capsaïcinoïdes du piment, les gingérols et shogaols du gingembre, l'eugénol des clous de girofle (figure i.25) (Fisher, 1992)...

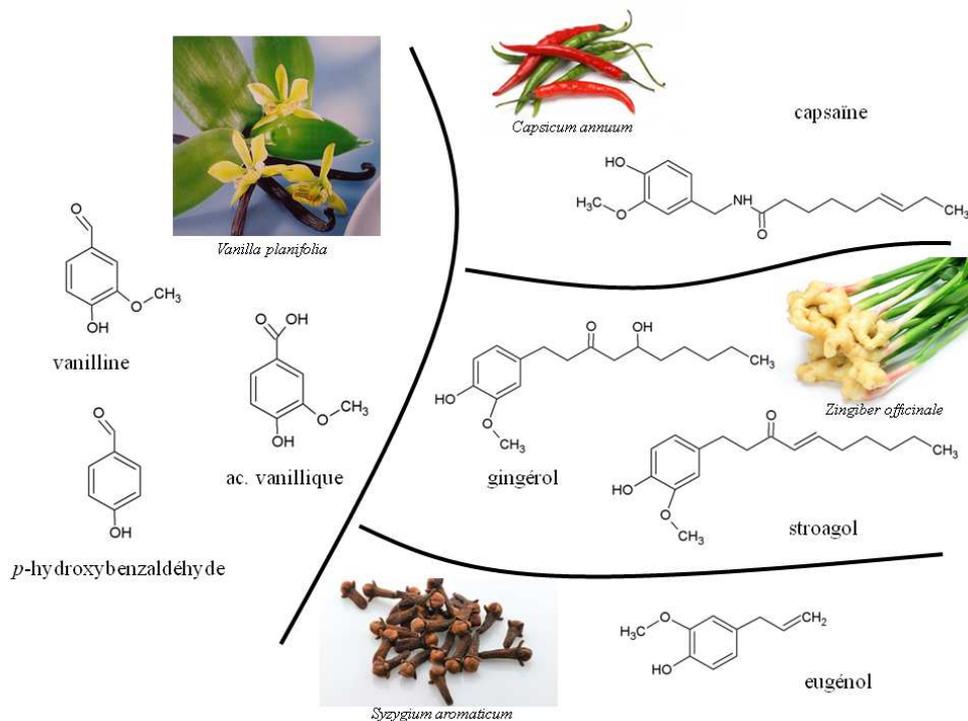


Figure i.25 : Divers composés phénoliques participant à la flaveur de produits végétaux : exemples de la vanille, du piment, du gingembre et du clou de girofle.

2.4.1.3. Composés phénoliques, astringence et amertume

Deux paramètres de la saveur des aliments sont directement liés aux composés phénoliques : l'astringence et l'amertume. Les phénols végétaux, flavonoïdes, isoflavones, terpènes et glucosinolates sont presque toujours liés à une sensation d'amertume ou d'astringence (Drewnoski et Gomez-Carneros, 2000). En plus de leur activité bactéricide (Scalbert, 1991), ces substances apportent une protection contre les prédateurs en rendant le végétal peu agréable d'un point de vue gustatif. Cette caractéristique est importante à prendre en compte dans une recherche de végétaux aux concentrations en phytonutriments plus élevées. En effet, cela engendre bien souvent des saveurs plus amères ou astringentes.

Les composés phénoliques à faibles poids moléculaires tendent à être amers alors que les polymères de plus hauts poids sembleraient être davantage astringents (Noble, 1994).

Les composés phénoliques responsables de l'amertume ont des structures très différentes. Chez le *Citrus*, il s'agit des glycosides de flavanones (ester hétérosidique de l'acide élénolique). Chez l'olive, l'oleuropéine (ester hétérosidique du dihydroxyphényléthanol) est responsable de ces propriétés. (figure i.26) (Horowitz et Gentili, 1969 ; Amiot *et al.*, 1986).

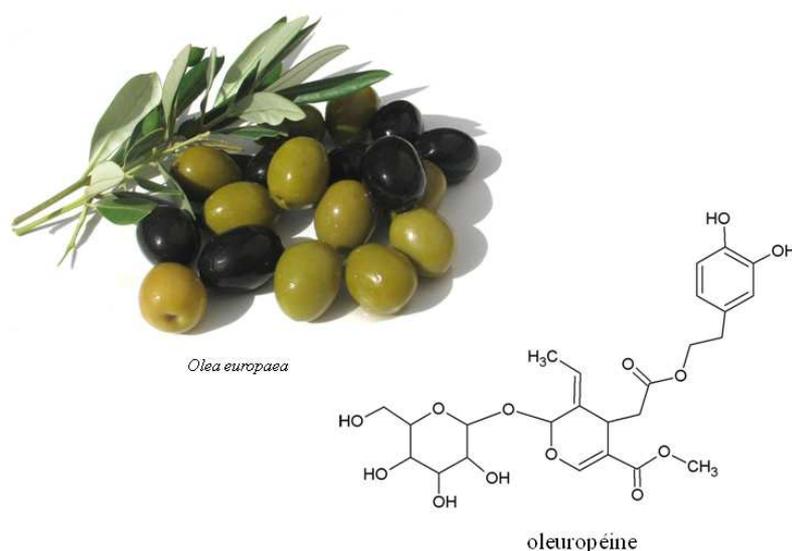


Figure i.26 : Structure chimique de l'oleuropéine.

Tout changement au niveau des molécules phénoliques amères peut conduire à d'importantes modifications du goût. Par exemple, chez les agrumes, l'ouverture de l'hétérocycle des flavanones conduit à la formation de dihydrochalcones ayant des saveurs sucrées (Horowitz et Gentili, 1969). Généralement, on trouve de fortes concentrations en composés phénoliques dans les jeunes pousses

et tissus. Cela serait en lien avec une stratégie de protection mise en place par la plante envers les tissus plus fragiles et plus important pour son devenir (Del Rio *et al.*, 1998).

La sensation d'astringence est provoquée par la liaison des tanins avec les protéines et glycoprotéines salivaires, conduisant à une diminution de la lubrification de l'intérieur de la bouche. L'astringence est une caractéristique des fruits jeunes et elle disparaît complètement dans les fruits mûrs (Fleuriet *et al.*, 1996).

2.4.2 Santé et bien-être : additifs alimentaires, médicaments et cosmétiques

A côté d'autres groupes chimiques importants (alcaloïdes, terpènes...), de nombreux composés phénoliques d'origine végétale peuvent jouer un rôle dans la santé humaine. Ils sont fréquemment commercialisés sous forme de préparations utilisées soit comme compléments alimentaires soit comme médicaments.

Comme cela a été vu précédemment, les antioxydants sont essentiels pour maintenir la qualité des aliments riches en lipides et les protéger des oxydations. Ceux-ci ont également un effet bénéfique direct sur la santé humaine en évitant l'accumulation des formes activées de l'oxygène, hautement réactives et susceptibles d'accélérer le vieillissement cellulaire chez l'Homme (Rice-Evans *et al.*, 1997). Un bon antioxydant est efficace à de faibles concentrations, a une compatibilité chimique et physique avec le substrat qu'il est censé protéger et est absent de toute toxicité et de qualité sensorielle propre. L'Homme n'est pas capable d'assurer la biosynthèse de la plupart des antioxydants, en particulier ceux de nature phénolique. C'est pourquoi, l'apport en ces composés se fait *via* l'alimentation. Les légumes et fruits sont particulièrement riches en composés phénoliques à forte capacité antioxydante (Kaur et Kapoor, 2001).

Cependant, un des problèmes majeurs avec ces antioxydants phénoliques ingérés par voie orale est que la réelle biodisponibilité reste inconnue. L'absorption de ces molécules peut être limitée au niveau de la barrière intestinale et des modifications métaboliques peuvent avoir lieu soit dans l'intestin sous l'action de la flore bactérienne, soit dans les tissus de l'organisme humain lui-même. Enfin, des concentrations élevées de ces composés peuvent entraîner des phénomènes de toxicité (Duthie *et al.*, 2003).

Les préparations à but thérapeutique peuvent être des mélanges naturels de molécules actives ou de molécules purifiées et éventuellement transformées par synthèse chimique. C'était le cas, par exemple, de l'acide acétylsalicylique (aspirine®), dérivé de l'acide salicylique naturellement présent dans les écorces des saules. Actuellement, l'aspirine est intégralement synthétisée chimiquement. Dans la plupart des cas, la nature active des composés naturels est reconnue bien avant que leur structure chimique n'ait été déterminée. Pour cela, l'expérience ancestrale des médecines et pharmacopées traditionnelles ainsi que les tests biologiques classiquement utilisés dans l'industrie pharmaceutique ont permis de les mettre en évidence et de les valoriser. Cependant, les progrès des techniques analytiques et d'identification structurale, souvent associés à la production de ces composés par des suspensions cellulaires végétales ont permis d'avancer rapidement dans l'étude des relations entre structure et activité biologique. Des propriétés telles que la protection contre les maladies coronariennes et vasculaires, l'activité anti-inflammatoire, anti-tumorale sont souvent associées aux composés phénoliques (Macheix *et al.*, 2005). Si une action chimiopréventive contre diverses maladies humaines peut être attribuée aux polyphénols présents dans notre alimentation, de par leur capacité à neutraliser les radicaux libres toxiques générés à partir des lipides, protéines et acides nucléiques sous des conditions de stress, une action de chimiothérapie peut également être exploitée par le développement de médicaments à base de composés phénoliques. Cela concerne de nombreuses maladies caractérisées par une plus forte intensité de stress oxydatif et donc qui se caractérisent par des taux cellulaires plus élevés de ROS. Ces composés, en plus de contribuer à empêcher la mort cellulaire, n'ont pas d'impact négatif sur les cellules saines. Les polyphénols végétaux possèdent des propriétés physicochimiques adaptées pour devenir des substances thérapeutiques caractérisées par une activité cytotoxique spécifique des cellules cancéreuses et cellules endommagées (Quideau *et al.*, 2011).

Néanmoins, un problème d'ordre technique, auquel peut être confrontée la recherche, réside dans le fait que les traitements technologiques appliqués aux organes végétaux conduisent généralement à de profondes modifications de leurs capacités antioxydantes.

Enfin, la cosmétologie fait largement appel aux composés phénoliques des végétaux. Ils participent, notamment, à la lutte contre le vieillissement cutané en tant que molécule anti-radicalaire (Macheix *et al.*, 2005).

2.4.3 Valorisation du végétal d'ornement

Nous avons vu précédemment que les polyphénols jouaient un rôle dans la couleur et l'odeur des végétaux. Ce sont donc des composés importants pour l'aspect global des végétaux, pour leurs qualités visuelles et décoratives. Une meilleure connaissance des contenus en composés phénoliques et des réseaux métaboliques sous-jacents apporterait des perspectives intéressantes et prometteuses pour la création variétale dans le domaine de l'horticulture ornementale. En effet, il est possible d'imaginer moduler la présence ou l'absence de certains composés phénoliques dans la plante afin de gagner des caractéristiques visuelles nouvelles pour certaines variétés. Cela constitue un marché non négligeable car les travaux dans le domaine de l'horticulture ornementale peuvent avoir un impact fort auprès des particuliers, très demandeurs en innovations.

De plus, l'induction de la production en certains polyphénols naturellement présents dans le végétal pourrait représenter un moyen de lutte efficace contre les pathogènes et améliorerait sa tolérance face à d'éventuelles attaques.

Une innovation pourra être identifiée comme telle si celle-ci peut être perçue, acceptée et rentable par et pour la société.

Pour conclure, les composés phénoliques regroupent un panel de molécules diverses ayant toutes en commun une structure de base composée d'au moins un cycle benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Cette famille de métabolites spécialisés regroupe des formes simples (les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques et les flavonoïdes) ainsi que des formes plus complexes (les tanins et les lignines). Leur localisation à l'échelle de la plante n'est pas anodine. On les retrouve généralement dans les jeunes tissus. Un lien entre ce constat et leur rôle de plus en plus décrit de composés de défense et de protection est facilement établi. En effet, la préservation de l'intégrité de ces organes jeunes représente un enjeu de survie pour la plante et l'espèce. De nombreux rôles sont liés à cet aspect de défense : capacité de détoxification des ROS, protection contre les rayons UVs,... Néanmoins, un autre aspect, qui demeure lié à cet enjeu de survie, concerne la mise en place de communications par le biais de ces composés phénoliques, assimilables à des molécules de signalisation. Certains de ces polyphénols sont effectivement impliqués dans l'attraction de pollinisateur afin d'assurer la persistance de l'espèce, et d'autres

encore dans l'établissement de relations symbiotiques. Ces composés phénoliques perdent donc peu à peu leur étiquette de produits « non essentiels » pour la plante.

Cette diversité métabolique constitue une ressource dotée d'un large spectre d'exploitation par et pour l'Homme. Le mot « ressource » vient de l'ancien verbe resourdre qui signifie « ressusciter, relever, remettre sur pied ». Ces ressources que représentent les polyphénols sont des moyens que nous offre la plante par son usage pour faire face à une situation difficile. Cette vision, certes, anthropique, illustre le fait que les investigations sur ces molécules dans le but d'apporter des connaissances supplémentaires ne peuvent être que bénéfiques et pourront probablement être exploitées ultérieurement. Les intérêts portés aux polyphénols sont déjà nombreux, car ils sont impliqués dans la qualité des aliments, notamment dans la conservation et les caractéristiques organoleptiques des produits. Ils sont également de plus en plus valorisés pour le bien-être et la santé humaine : additifs alimentaires, cosmétiques et de médicaments.

Chaque espèce végétale dans son originalité métabolique constitue alors une ressource non négligeable à étudier et préserver. Parmi celles-ci, la chicorée est une plante dont les bienfaits pour l'Homme sont reconnus depuis longtemps. Elle était notamment déjà utilisée comme boisson dotée de vertus bienfaisantes au temps des grandes dynasties égyptiennes. Actuellement, c'est une plante largement consommée à travers le monde que ce soit en salade ou en produits dérivés. Dans la partie suivante cette espèce, véritable culture emblématique du Nord de la France, sera présentée ainsi que son originalité d'un point de vue métabolique.

3 La chicorée, ressource emblématique du Nord de la France

3.1 Description botanique et cycle de développement

La chicorée appartient à la famille des *Asteraceae*, sous-famille des *Cichorioideae*, tribu des *Cichoraceae*, genre *Cichorium*. C'est une plante annuelle, bisannuelle ou vivace, commune des prés, lieux incultes et bords des chemins. Elle est originaire des zones semi-arides méditerranéennes ou de l'Himalaya selon les espèces et est actuellement répandue dans tout l'hémisphère nord. Selon les variétés, elle est cultivée pour ses racines ou la production de salades et d'endives. Ses feuilles en rosette, d'aspect semblable à celles du pissenlit, sont profondément lobées. La tige longue et frêle de chicorée porte de maigres rameaux rigides et se garnit à la fin de l'été d'élégants capitules composés de fleurs en languette, d'un tendre bleu pâle. Cependant, des chicorées aux fleurs mauves ou blanches existent également (figure i.27). La plante laisse s'écouler à la coupure un latex blanc très amer.



Figure i.27 : Planche botanique de *Cichorium intybus* (représentation Carl Lindman) et fleurs de chicorée

Le genre *Cichorium* regroupe 6 espèces : *intybus* L., *endivia* L., *pumilum* Jacq., *calvum* Sch. Bip. Ex Asch., *spinosum* L., *bottae* Deflers. A l'état sauvage, *C. intybus*, *C. spinosum* et *C. bottae* sont des

espèces pérennes, les 3 autres sont annuelles. Les espèces *spinosum*, *endivia* et *intybus* sont présentes en Europe (figure i.28) (Kiers, 2000). Elles possèdent un mode de pollinisation entomophile. *C. endivia* est préférentiellement autogame alors que les deux autres sont allogames, l'allofécondation étant favorisée par la présence d'un système d'auto-incompatibilité sporophytique (Eenink, 1981 ; Gonthier *et al.*, 2013), d'un phénomène de compétition pollinique (Eenink, 1982) et d'une morphologie florale défavorable à l'autofécondation (Desprez *et al.*, 1994).

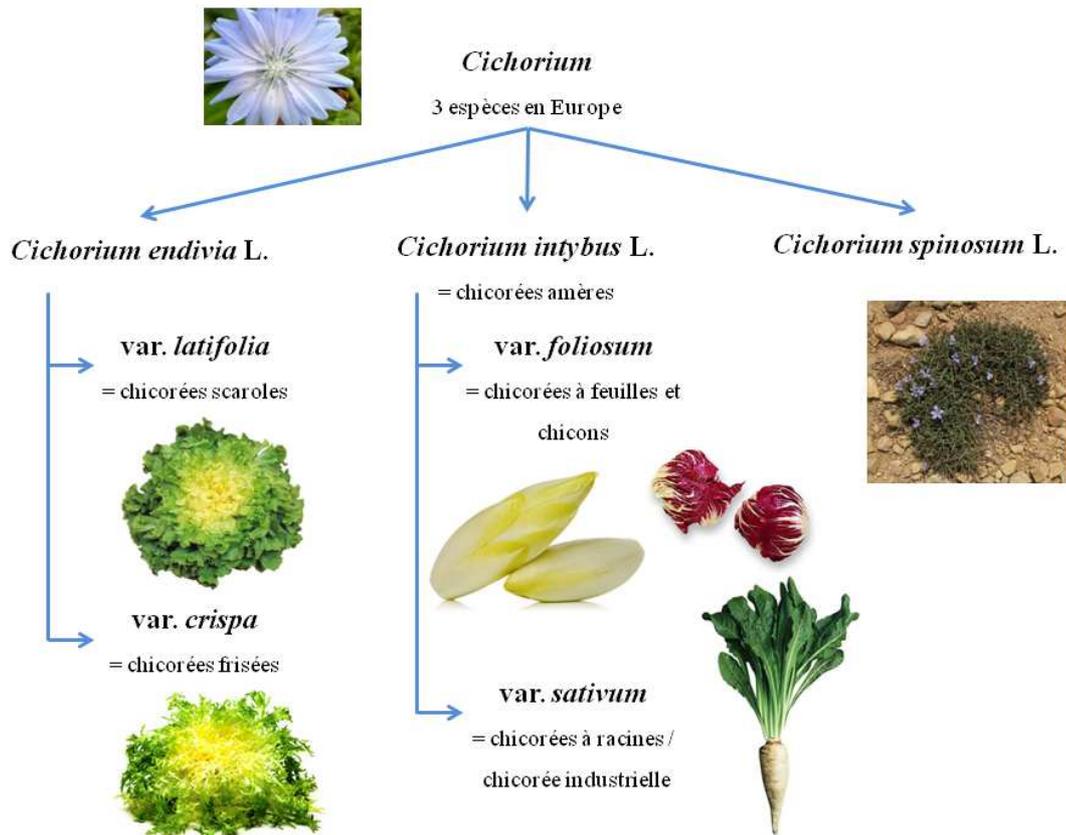


Figure i.28 : Classification des chicorées présentes en Europe et variétés cultivées.

Seules les espèces *endivia* et *intybus* sont cultivées. Le cycle de développement de ces espèces est composé de deux phases : la phase végétative, de la germination au stade pommaison ou racine tubérisée et la phase reproductive, de l'initiation florale à la maturation de la graine. Pour la production de graines, les variétés agronomiques de *C. intybus* sont généralement cultivées de façon bisannuelle à l'exception de certaines chicorées italiennes. Durant la première année après la germination, la plante se présente au stade végétatif : une rosette de feuilles se forme puis une racine tubérisée accumule des réserves azotées et carbonées (Limami *et al.*, 1993). Ces réserves sont remobilisées au printemps suivant, lors de la montaison, pour la formation d'une hampe florale

pouvant atteindre jusqu'à 2 m de haut. Les capitules bleus sont constitués de 15 à 25 fleurs. La floraison de l'ensemble des fleurs d'un capitule est synchrone, se déroule en quelques heures et s'étale de juillet à septembre. Ce cycle est donc réduit à une année pour *C. endivia* (figure i.29).

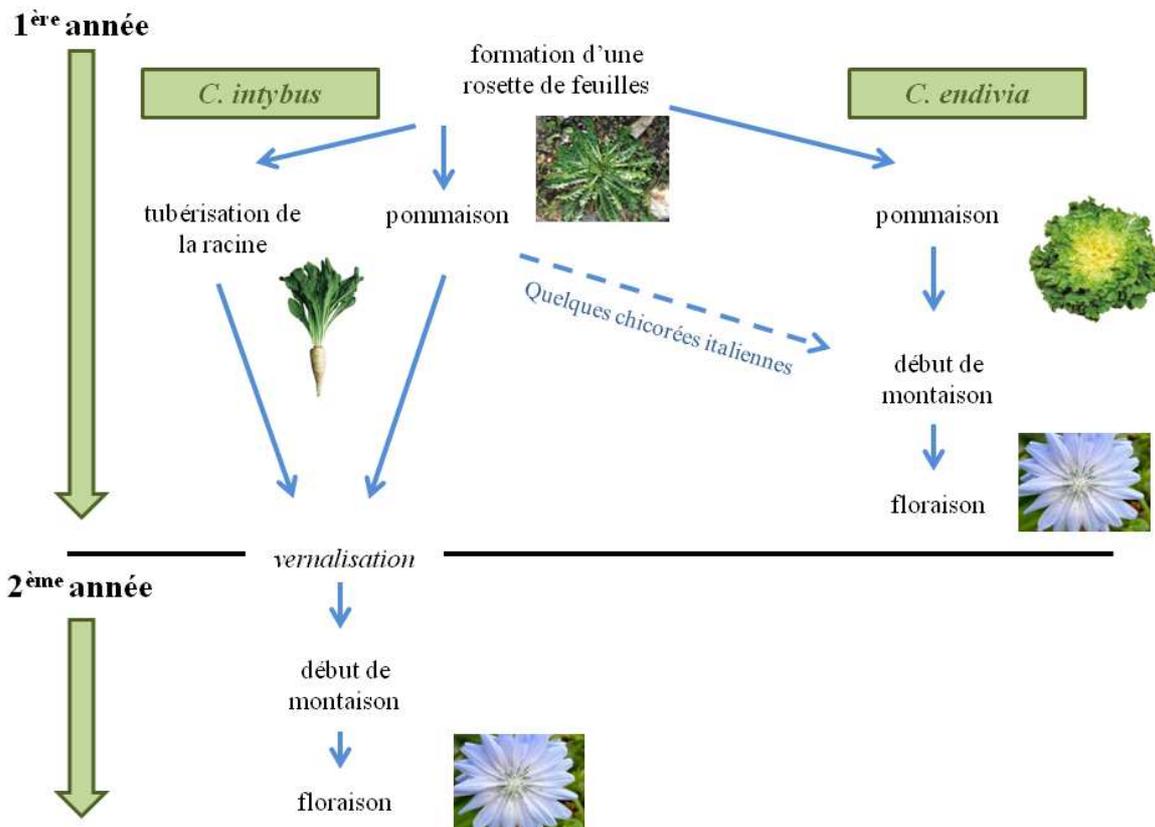


Figure i.29 : Cycle de développement des chicorées cultivées

3.2 Symbole et croyances populaires

Quelques croyances populaires sont associées à la chicorée. Les fleurs bleues seraient notamment les yeux d'une jeune fille pleurant le départ du bateau de son bien-aimé à jamais parti. Dans le même style, une autre légende dans le folklore allemand, veut qu'une jeune fille ne pouvant cesser de pleurer son amoureux mort ait été transformée en chicorée. Ces croyances, ont probablement contribué à l'association de propriétés ophtalmologiques à cette plante, selon la théorie des signatures. En effet, l'eau distillée de ses fleurs bleues était utilisée pour soigner l'inflammation des yeux ou la mauvaise vue.

Dans l'iconographie chrétienne du Moyen-âge, la chicorée symbolisait la persévérance dans le martyr. On la retrouve illustrant une représentation du martyr de Saint Sébastien datant de 1487. Les fleurs peuvent, en effet, faire penser à de nombreuses flèches hérissées en son centre, évoquant l'épisode du martyr de ce chrétien du III^{ème} siècle. Saint Sébastien, « couvert de pointes comme un hérisson » survécut à ce premier supplice et fut achevé à coup de bâtons jusqu'à ce que mort s'ensuive (figure i.30).

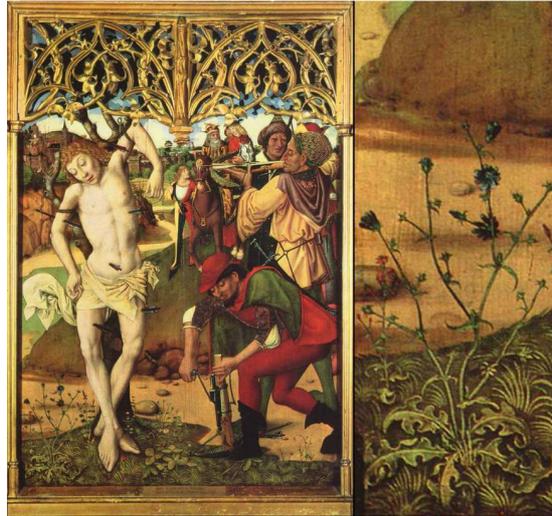


Figure i.30 : Martyr de saint Sébastien, tableau de l'autel saint Guy de l'église des Augustins Ermites de Nuremberg (1487).

A droite, détail du tableau montrant la chicorée.

3.3 Une utilisation ancienne

La chicorée est depuis longtemps utilisée comme plante alimentaire et médicinale. Néanmoins, il n'est pas encore possible de dater le début de sa culture par l'Homme. Des traces de chicorée ont été retrouvées dans des restes de feu de bois d'hommes des cavernes. La chicorée était sans doute, mangée grillée (Short *et al.*, 2015). Cela nous laisse donc à penser que sa consommation est très ancienne. Le document le plus ancien la mentionnant est le papyrus Ebers, écrit vers 1600 avant Jésus Christ (figure i.31 – A). Il nous apprend que les égyptiens la consommaient en apéritif pour son effet digestif. Les notions de bien-être et de santé sont alors déjà fortement associées aux intérêts culinaires de cette plante. Plus tard, les grecs et les romains voyaient en elle une alliée pour guérir les maladies du foie ou de l'estomac. Dioscoride, médecin grec au I^{er} siècle après J.-C., en fait état dans son ouvrage *De materia medica*, ouvrage botanique décrivant l'utilisation médicale de 1000 substances dont les quatre cinquième sont issus des végétaux (figure i.31 – B). Pline l'ancien la

décrit également dans son ouvrage *Naturalis historia*. Quant à Galien (IIème siècle après J.-C.), il l'appelait « l'amie du foie » et de nombreux auteurs s'accordaient pour chanter ses louanges et lui reconnaître ses qualités apéritives, digestives, cholagogues, diurétiques, dépuratives (figure i.31 – C et D)... Les premiers bénéficiaires à l'époque étaient principalement les armées. En plus d'être anti-inflammatoire, propriété évidemment bien utile dans le cas de blessures, la chicorée limitait les pertes humaines grâce à ses bienfaits digestifs. En effet, l'une des principales causes de mortalité dans les armées était simplement les coliques et diarrhées liées aux perturbations de régimes alimentaires à cause des nombreux déplacements.

Au début du IXème siècle, Charlemagne écrit le capitulaire *De Villis* qui livre à l'ensemble des gouverneurs de ses domaines une liste de plantes à cultiver dont une vingtaine de plantes médicinales comprenant la chicorée (figure i.31 – E). Grâce à ces prémices des pharmacies, l'usage médicinal de la chicorée se démocratise et est donc utilisée pour soigner la population. Au fil du temps, les moines amélioreront la plante d'un point de vue agronomique pour la consommation sous forme de décoction de racines. Au cours des siècles qui suivirent, elle fut aussi préconisée dans beaucoup de cas : contre la gale, la jaunisse, la fièvre, les dermatoses, les rhumatismes. Même Louis XIV soigna ses nausées à l'aide d'un remède à base de sirop de chicorée.



Figure i.31 : Quelques documents et témoins de l'utilisation ancienne de la chicorée. A : une page du papyrus Ebers, B : représentation de Dioscoride, C : représentation de Galien, D : frontispice de *Naturalis historia* (édition 1669) et représentation de Pline l'ancien, E : jardin médiéval et représentation de Charlemagne.

Les hollandais semblent être les premiers à avoir mis au point la torréfaction de la chicorée de façon industrielle (XVII^{ème} siècle). Ce procédé gagna ensuite l'Allemagne, la Belgique et la France. Son utilisation est d'autant plus importante sous la révolution française puis lors du blocus continental décrété par Napoléon, du fait de ses avantages économiques par rapport au café. En effet, à l'inverse du café, la chicorée est une culture locale. A partir de cette période, son usage alimentaire prit le pas sur son utilisation médicinale (Kandeler and Ullrich, 2009). Enfin, la chicorée ajoutée dans le café amène de la stabilité gustative, en faisant un produit très apprécié et ancré dans une culture populaire, principalement dans le Nord de la France. En effet, dans une certaine tradition d'accueil, il n'est pas rare de trouver, dans les foyers, une casserole de café qui traîne tout au long de la journée, café prêt à être resservi...

3.4 Utilisations agro-alimentaires

La chicorée comprend de nombreuses variétés ou cultivars pouvant être groupés en 3 catégories selon leur utilisation agronomique. La chicorée industrielle (*C. intybus* var. *sativum*), cultivée pour ses racines, est utilisée pour la production d'un substitut au café ou d'inuline et fructanes, molécules d'intérêt pour l'industrie alimentaire et médicale. La chicorée est également un produit de l'alimentation, consommée en tant que salade ou légume (*C. endivia*, *C. intybus* var. *foliosum*) ou sous forme de farine. Enfin, elle est aussi utilisée en tant que plante fourragère (*C. intybus*, *C. botae*)

3.4.1 Les chicorées de l'espèce *Cichorium endivia*

La culture de l'espèce *Cichorium endivia* L. remonte à l'Antiquité dans le bassin méditerranéen et est répandue en Europe et au Moyen-Orient. Elle est composée des cultigrupes chicorées scaroles et chicorées frisées sélectionnées depuis l'Antiquité pour la consommation de feuilles en salades. Ces deux formes cultivées forment des rosettes à cœur dense et fourni dont les feuilles sont généralement consommées après blanchiment. C'est l'endive au sens stricte.

Les chicorées scaroles (var. *latifolia*) sont caractérisées par des feuilles entières assez amples plus ou moins gaufrées et à marge plus ou moins dentelée. Les chicorées frisées (var. *crispa*) présentent des feuilles plus nombreuses, étroites, profondément découpées et dentelées.

3.4.2 Les chicorées de l'espèce *Cichorium intybus*

L'espèce *intybus* présente une grande variabilité et comporte deux types très différents, cultivés soit pour la production de feuilles, soit de racines : *C. intybus* var. *foliosum*, les chicorées à feuilles, et *C. intybus* var. *sativum*, les chicorées industrielles ou à racines (Lucchin *et al.*, 2008).

3.4.2.1. Les chicorées à feuilles

Ces chicorées sont très diverses. Elles sont, pour la plupart, surtout connues et cultivées en Italie et sont de plusieurs types : chicorées à feuilles rouges ('Chioggia', 'Treviso', 'Verona'...), à feuilles panachées ('Castelfranco' au feuillage vert-jaune et rouge) ou à feuilles vertes ('Grumolo'...). Ce dernier type comprend également le cultigroupe des barbes de capucin, des chicorées pain de sucre et des catalognes (figure i.32).



Figure i.32 : Les variétés de chicorée à feuilles de l'espèce *Cichorium intybus*

La chicorée witloof (ou chicorée de Bruxelles ou chicon) dérive du point de vue génétique d'une chicorée à grosse racine (*C. intybus* var. *sativum*), la chicorée de Magdebourg. C'est l'endive au sens large. Le chicon serait né par hasard au XIX^{ème} siècle. On dit que pendant la révolution belge de 1830, un agriculteur de Scharbeek-les-Bruxelles dut quitter précipitamment sa ferme. Lorsqu'il revint plusieurs mois après, il constata que les racines de chicorées qu'il avait recouvertes de terre dans sa cave avaient développé des feuilles blanches imbriquées les unes dans les autres. La chicorée 'Witloof' (terme flamand signifiant « feuilles blanches ») était née. Afin de limiter les montées à graines en première année de culture, elle a été sélectionnée dans nos régions en tant que plante bisannuelle. Elle est caractérisée par l'aptitude de sa racine à développer un bourgeon ou chicon en conditions artificielles de culture (forçage en salle ou pleine terre avec ou sans terre de couverture) (figure i.33). Le chicon est obtenu en fin de première année, la production de graines nécessite une deuxième année. Les graines sont semées en mars-avril et les plantes récoltées en septembre. Les feuilles sont alors coupées au niveau du collet et les racines sont soumises au forçage. Dans l'obscurité et avec une température avoisinant les 16-18°C sous humidité saturante, l'activité végétative reprend et génère des bourgeons étiolés au bout de trois semaines. Ces chicorées aux feuilles blanches sont commercialisées ensuite sous le nom (impropre) d'endives, l'appellation chicon étant plus spécifique du Nord de la France et de la Belgique francophone.

La France est le premier producteur mondial de chicons dont 77 % de la production est concentrée dans le Nord-Pas-de-Calais et la Somme. Cela représente 20000 tonnes de chicons produits par an.

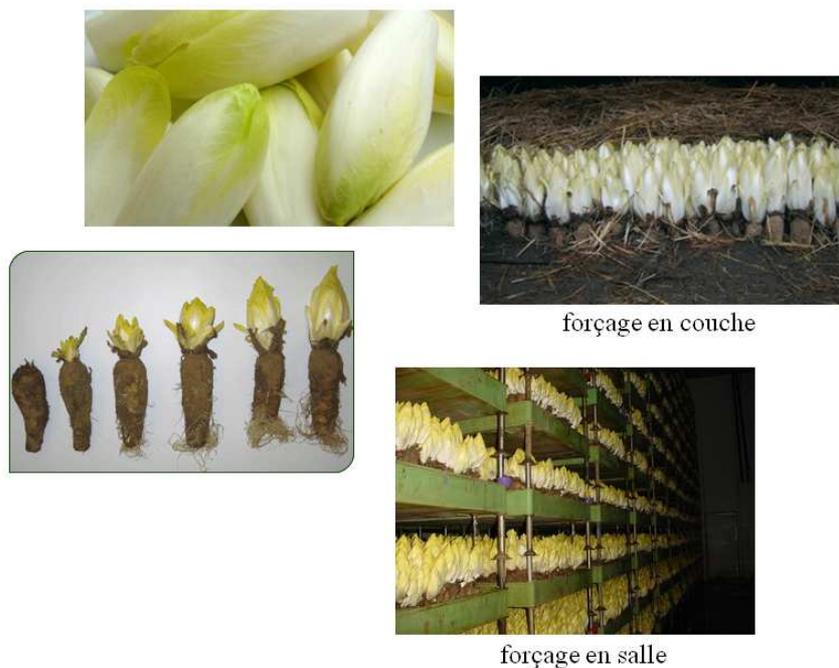


Figure i.33 : Forçage de chicons (pleine terre ou hydroponie)

3.4.2.2. Les chicorées industrielles

Dans cette catégorie, c'est la racine qui est exploitée. Le cultigroupe le plus important comprend les chicorées à torrifier et les chicorées à sucre pour lesquelles des cultivars peuvent être communs.

Les chicorées à torrifier

La chicorée à café, ou chicorée à torrifier, est une variété de chicorée à grosse racine cultivée pour la production d'un succédané de café, couramment appelé simplement chicorée. Si la boisson à base de chicorée n'est pas nécessairement l'équivalent du café sur le plan gustatif, elle a trouvé sa place sur le marché comme boisson naturelle exempte de caféine. Auparavant commercialisée en paquets de chicorée sèche qui sera bouillie dans de l'eau ou du lait, elle l'est plus souvent actuellement sous forme de poudre soluble ou de concentré liquide. On la retrouve aussi en mélange avec du café dans la Ricorée, produit populaire commercialisé par la marque Nestlé (figure i.34) et plus récemment sous forme de dosettes.



Figure i.34 : Produits dérivés de la chicorée à café

La France est le premier producteur de chicorée industrielle au monde avec 90 000 tonnes produites par an. Le principal transformateur de chicorée est la société Leroux installée à Orchies. Le deuxième

torréfacteur de chicorée est la société chicorée du Nord SARL installée à Oye-Plage dans le Pas-de-Calais.

Plusieurs étapes de transformation sont nécessaires pour l'obtention de ces différents produits. Après récolte des racines, ces dernières sont lavées puis tronçonnées en fines lamelles appelées cossettes. Celles-ci sont séchées ou déshydratées, cette étape pouvant se faire à l'air libre dans des hangars abrités. Ces cossettes sont ensuite torréfiées, c'est-à-dire qu'elles sont grillées à environ 150°C. Au cours de la torréfaction, l'inuline est dégradée en monomères de fructose (Böhm *et al.*, 2005). L'intybine, alcaloïde amer, combinée au fructose apporte la saveur spécifique de la chicorée. Enfin, arrive l'étape du concassage des cossettes en fines particules, suivi du conditionnement, soit en poudre, soit en grains, soit sous forme liquide.

Pour la fabrication des produits solubles et du concentré liquide, la chicorée a besoin d'être liquéfiée. Dans ce cas, les grains torréfiés sont acheminés vers des extracteurs. Ils sont alors immergés dans l'eau chauffée à 90°C pendant 1h. Le jus de chicorée liquide est ensuite filtré, centrifugé puis concentré par évaporation.

Pour obtenir la chicorée soluble, il reste alors à atomiser l'extrait de chicorée. Cette étape nécessite des infrastructures importantes, notamment des tours relativement hautes (37m pour les tours Leroux). Grâce à un courant d'air chaud qui balaie l'intérieur de la tour, l'extrait de chicorée liquide asséché retombe en poudre fine. C'est la chicorée soluble.

Les chicorées à sucre

La chicorée est une source importante de sucres : 180 000 tonnes d'inuline sont extraites des racines de chicorée par an en France. L'inuline, polymère de réserve stocké dans les organes souterrains de la chicorée, est constituée d'une répétition d'unités de fructose (2 à 70) et comporte généralement une molécule de glucose (figure i.35 - A). En effet, la synthèse d'inuline est initiée avec une molécule de saccharose. Les céréales, les oignons, l'ail, l'artichaut, le topinambour et la chicorée sont les principales sources d'inuline à disposition. Néanmoins, l'artichaut et la chicorée sont les deux seules plantes à contenir assez d'inuline pour que son extraction soit rentable d'un point de vue économique.

Dans l'alimentation, l'inuline, lorsqu'elle est ingérée, parvient au colon pratiquement intacte et est assimilée lentement (Bonnema *et al.* 2010). Cette fibre alimentaire a une action bénéfique sur la santé en stimulant la croissance ou l'activité de certaines bactéries (Kleesen *et al.*, 2007 ; Wiele *et al.*,

2004). Son effet prébiotique renforce donc l'immunité générale de l'individu et la rend performante contre les problèmes gastrointestinaux (Den Hond *et al.*, 2000). Cela amènerait même à réduire des risques de cancer des intestins. L'inuline de chicorée permet également une meilleure absorption du calcium pour les os (Robertfroid *et al.*, 2002).

L'hydrolyse de l'inuline permet la libération de fructoses. L'inuline et ces oligofructoses sont des constituants alimentaires obtenus industriellement à partir de la racine de chicorée et qui présentent une combinaison unique de propriétés nutritionnelles et de bénéfices technologiques (Franck, 2002). Les oligofructoses conviennent parfaitement comme édulcorants naturels dans des boissons rafraîchissantes, des crèmes glacées et diverses pâtisseries. Le fructose contient autant de calories que le glucose, mais il n'est pas nécessaire d'en apporter autant étant donné que son niveau édulcorant est plus élevé. L'inuline montre des caractéristiques gélifiantes intéressantes lorsqu'elle est utilisée en gel dans de l'eau. L'intérêt de l'utilisation d'inuline comme constituant est qu'elle n'affecte pas le goût du produit et améliore même ses qualités organoleptiques. De plus, son apport n'engendre pas d'enrichissement en matières grasses (Franck et Coussement, 1997 ; Kim *et al.*, 2001 ; Franck, 2002).

Outre l'intérêt alimentaire, l'inuline peut également être une source d'adoucesseur pour l'eau. La carboxyméthylinuline (CMI) obtenue à partir de l'inuline s'utilise pour éliminer les traces de calcaire et autres sels dans les systèmes d'eau (figure i.35 - B) (Verraest *et al.*, 1996 ; Boels et Witkamp, 2011). Cette molécule peut être également utilisée comme détergent (Besemer et Van Bekkum, 1994).

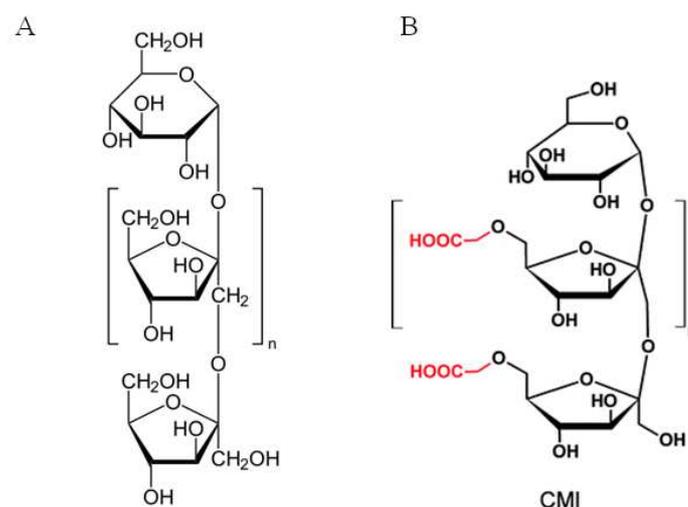


Figure i.35 : Structures chimiques de l'inuline (A) et de la carboxyméthylinuline (B)

Après extraction de l'inuline des racines de chicorée, il subsiste certains sous-produits, à savoir des pulpes déshydratées ou surpressées, des morceaux de racines de chicorées et des écumes. La pulpe de chicorée est utilisée comme complément dans les produits alimentaires pour le bétail ou pour les animaux domestiques. Les écumes améliorent la structure du sol et corrigent le pH des terres acidifiées, celles-ci contiennent de l'azote, du phosphore et du sodium. Les divers fragments végétaux subsistant, peuvent, quant à eux, être utilisés en alimentation directe pour le bétail ou en ensilage.

Autres utilisations des racines (figure i.36)

Les racines de la chicorée de Soncino, étroites et cylindriques, sont consommées cuites comme des salsifis.

La chicorée est aussi un ingrédient utilisé en boulangerie et pâtisserie, sous la forme de farine. Elle est obtenue par broyage des cossettes séchées avant torréfaction, celle-ci améliore le processus de panification en apportant du moelleux tout en améliorant la saveur et la conservation du produit (Franck, 2002).

Enfin, les racines de chicorée peuvent également être utilisées pour la fabrication de croquettes pour chiens et chats. Ce produit est censé assurer une bonne digestibilité.



Figure i.36 : Diverses autres valorisations des racines de *Cichorium intybus* var. *sativum*

Ces dernières années, des études ont été réalisées sur la classification des différentes variétés de *C. intybus*. Deux variétés seraient insuffisantes pour décrire la variabilité de cette espèce. Ainsi, des travaux de 2013 en proposent 5, tout en précisant que des études supplémentaires sont encore nécessaires (Hammer *et al.*, 2013):

- *C. intybus* var. *intybus* : variétés primitives et d'autres cultivées telles que la 'Barbe de Capucin', la 'Catalogna' et la 'Spadona'
- *C. intybus* var. *sativum* : chicorées à racine (industrielle)
- *C. intybus* var. *foliosum* : chicons
- *C. intybus* var. *porphyreum* : chicorées radicchio ('Castelfranco', 'Chioggia', 'Treviso'...)
- *C. intybus* var. *latifolium* : chicorées pain de sucre

3.4.3 La chicorée fourragère

Cichorium botae et quelques variétés de *Cichorium intybus* sont utilisées en tant que plantes fourragères dans certains pays tels que la Nouvelle Zélande, la Belgique et le Royaume-Uni. Les premières utilisations en tant que fourrage datent des années 1980. Elle est particulièrement appréciée car sa valeur alimentaire est équivalente à celle du Ray-Grass ou du trèfle blanc (Kunelius and Mc Rae, 1999). Elle est très riche en minéraux (Sanderson *et al.*, 2003) et elle possède des propriétés vermifuges et anti-parasitaires (Molan *et al.*, 2000). De plus, d'un point de vue agronomique, la chicorée résiste au froid et aux sécheresses estivales grâce à son système racinaire en pivot (Rumball, 1986). Elle se distingue donc de l'herbe des prés qui s'assèche à l'approche des premières chaleurs de l'été. Malgré tout, des travaux d'amélioration végétale se concentrent sur des variétés moins amères, car les composés responsables de l'amertume amènent un mauvais goût au lait de vache (Rumball *et al.*, 2003). L'utilisation de chicorée fourragère tend à s'étendre en France également.

Enfin, récemment, il a été remarqué que la chicorée pourrait avoir un bel avenir dans l'alimentation porcine. En effet, cette filière est concernée par le problème de la viande de verrat, dans certains cas, impropre à la consommation car celle-ci est imprégnée d'une odeur forte. Pour palier à ce problème, les jeunes porcs sont castrés avant que l'odeur, d'origine sexuelle, ne contamine leur viande. Or, des modifications du régime alimentaire (adjonction de chicorée) ont montré qu'il était possible de réduire cette odeur et ainsi d'améliorer la qualité de la viande (Roepstorff *et al.*, 2005). Cette technique permettrait d'éviter la castration des porcs.

3.5 Les métabolites spécialisés de la chicorée

On retrouve chez la chicorée sauvage quatre acides hydroxycinnamiques majeurs : les acides caftarique (caféoyltartrique ; CTA), chicorique (dicaféoyltartrique ; diCTA), chlorogénique (3-O-caféoylquinique ; 3-CQA) et isochlorogénique (3,5-dicaféoylquinique ; 3,5-diCQA) (figure i.37) (Heimler *et al.*, 2007). L'acide chicorique est le composé le plus abondant en général, il représente chez certaines variétés jusqu'à 75% de la quantité totale en composés phénoliques dans les feuilles (*C. intybus* var *foliosum* 'Witloof') (Innocenti *et al.*, 2005). De nombreux dérivés et isomères ont également été mis en évidence au cours de différents travaux. Mulinacci et son équipe font notamment état, par exemple, de la présence d'acide caféoylféruloyltartrique chez *Cichorium intybus* (Mulinacci *et al.*, 2001).

Des flavonoïdes sont également produits par la chicorée, principalement dans les parties aériennes : des glucosides de quercétine et de kaempferol (flavonols) et des glucosides de lutéoline et d'apigénine (flavones) (figure i.37) (Heimler *et al.*, 2009). Les chicorées à feuilles rouges de la sous-espèce *foliosum* chez *C. intybus* ('Chioggia', 'Treviso',...) renferment des anthocyanes responsables de cette coloration originale. La cyanidine et ses dérivés sont retrouvés dans tous les différents cultivars en général. Puis, certains composés sont plus spécifiques : 'Chioggia' et 'Treviso' produisent des dérivés de delphinidine, 'Verona', des dérivés de malvidine, les dérivés de pétunidine ne sont présents que chez 'Chioggia'... (figure i.11) (Carazzone *et al.*, 2013). La delphinidine sous diverses formes glycosylées est aussi présente dans les fleurs bleues de chicorée (Nørbæk *et al.*, 2002).

Chez la chicorée, les composés phénoliques auraient un rôle de défense particulièrement ciblé contre les insectes, notamment de la part de la cichoriine (6,7-dihydroxycoumarine 7-glucoside). Le rôle de barrière contre les attaques d'herbivores est, quant à lui, davantage attribué à trois sesquiterpènes lactones (lactucine, lactupicine et 8-déoxylactucine) (figure i.37). Ce sont des terpènes sécrétés particulièrement dans le latex de la plante et impliqués dans l'amertume de la chicorée. La cichoriine est présente dans les feuilles alors que les sesquiterpènes lactones sont présents à la fois dans les racines et les feuilles. Ces 4 composés se trouvent dans la plante à des concentrations suffisantes pour être effectives dans leur rôle protectif. En ce qui concerne l'acide chlorogénique, il a été identifié comme facteur de résistance face aux thrips (*Frankliniella occidentalis*) sévissant sur les cultures de chrysanthème (*Dendranthema grandiflora*) (Leiss *et al.*, 2009). D'autres composés phénoliques, comme l'acide chicorique, ne semble pas contribuer directement à éloigner les insectes et animaux herbivores, mais ils pourraient renforcer l'efficacité des 4 principaux composés énoncés ci-avant. Cela n'a pas été établi expérimentalement (Rees et

Harborne, 1985). Au vu de l'influence significative de la position foliaire sur le contenu en composés phénoliques, l'hypothèse du rôle de protection de ces composés phénoliques envers des organes jeunes peut être de nouveau formulée (Sinkovič *et al.*, 2014).

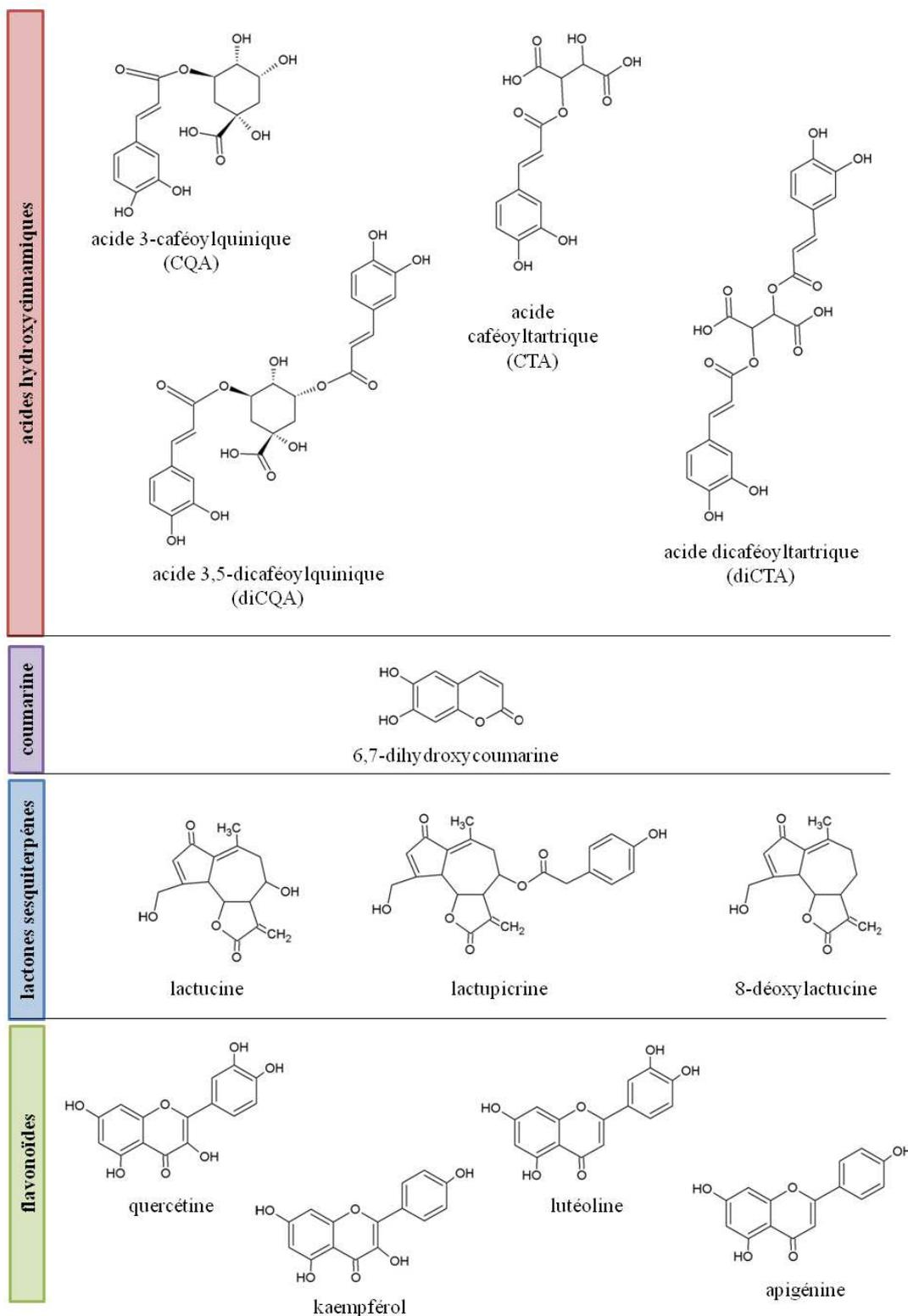


Figure i.37 : Principaux métabolites spécialisés de la chicorée (formes non glycosylées)

L'ensemble des composés phénoliques ont été identifiés chez la chicorée par HPLC et SM (Carazzone *et al.*, 2013) (tableau i.2).

De par sa teneur en inuline et en composés antioxydants, la chicorée peut constituer un additif alimentaire intéressant. De plus, les produits cosmétiques à base de chicorée auraient un effet «lissant et tenseur» et serait un «anti-âge à long terme». L'acide isochlorogénique est notamment utilisé comme composant d'une crème pour la peau (« Le lift » - Chanel). Le seul frein à l'utilisation des polyphénols en cosmétologie est leur forte réactivité à l'oxydation et leur instabilité dans les formulations cosmétiques, conduisant à des variations de couleur et d'odeur. Des études sont réalisées pour limiter cet effet (Closs, 2002).

Enfin, les extraits de chicorée sont dotés de nombreuses propriétés thérapeutiques : anti-cancéreux (Chen *et al.*, 2004 ; Hazra *et al.*, 2002 ; Pool-Zobel, 2005), anti-inflammatoires (Ripoll *et al.*, 2006), anti-bactériens (Tursunay *et al.*, 2009)... Les bienfaits des acides dicaféoylquiniques et tricaféoylquiniques sont nombreux et seront exposés plus en détails dans le chapitre 3.

La chicorée est utilisée depuis longtemps comme plante alimentaire mais aussi pour ses vertus médicinales et conserve un potentiel de valorisation encore prometteur. De nos jours, les chicorées présentent une grande diversité de formes et de couleurs : chicorées scaroles, frisées, de Choggia... Son originalité métabolique, notamment de par sa composition en composés phénoliques, est un atout et un levier d'action non négligeable. D'un point de vue fondamental, la synthèse de ces produits naturels est encore ponctuée de zones d'ombre. L'intérêt se porte sur ces composés car ils occupent une place importante au sein du métabolisme et du fonctionnement physiologique de la plante. De plus, ils sont convoités pour leur utilisation dans des produits-santé tels que des médicaments ou compléments alimentaires. Mais aussi, l'étude de ces métabolismes particuliers a un intérêt pour des travaux d'amélioration variétale et de diversification. En effet, des recherches, par exemple, sur les composés responsables de l'amertume sont en cours afin d'imaginer pouvoir, après un travail de sélection, mettre sur le marché des variétés au goût moins amer et ainsi diversifier l'offre actuelle en chicorées.

Tableau i.2 : Les composés phénoliques de *Cichorium intybus* et données UV-visible, MS et MSⁿ (Carazzone *et al.*, 2013)

N°	UV λ_{max} (nm)	m/z	MS ⁿ m/z	Identification
1 ^{*,a}	210	133	MS ² [133]: 115 (100), 89 (3)	Malic acid
2 [*]	260	179	MS ² [179]: 135 (100)	Caffeic acid
3 ^{*,a}	220, 272	191	MS ² [191]: 173 (50), 127 (30), 111 (100)	Quinic acid
4 ^a	250, 323 303sh	353	MS ² [353]: 191 (100), 179 (50), 135 (5)	3-Caffeoylquinic acid
5 [*]	246, 324 310sh	353	MS ² [353]: 191 (100), 179 (3)	5-Caffeoylquinic acid
6 ^a	252, 324 303sh 303sh	353	MS ² [353]: 191 (15), 179 (60), 173 (100)	4-Caffeoylquinic acid
7 ^{a,b,c}	246, 324 310sh	353	MS ² [353]: 191 (100), 179 (2)	cis-5-Caffeoylquinic acid
8 ^{a,d}	232, 277, 321	311	MS ² [311]: 179 (41), 149 (100), 135 (3)	cis-Caftaric
9 ^d	241, 327 310sh	311	MS ² [311]: 179 (80), 149 (100), 135 (5)	trans-Caftaric acid
		623	MS ² [623]: 491 (100), 311 (94)	
10 ^{a,c,d}	245, 320	335	MS ² [335]: 179 (10), 161 (100), 135 (45)	5-Caffeoylshikimic acid
11 ^d	241, 321 300sh	337	MS ² [337]: 191 (100)	5- <i>p</i> -Coumaroylquinic acid
12 ^a	256, 352	727 ⁺	MS ² [727]: 479 (100), 303 (28) MS ³ [479]: 303(100)	Quercetin-3-O-glucuronide-7-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
13 ^d	264, 366	697 ⁺	MS ² [697]: 535 (65), 449 (100), 287 (30)	Kaempferol-3-O-glucosyl-7-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
14		519	MS ² [519]: 259 (100), 215 (25)	Dimer of unknown acid
15 ^a	234, 324	363	MS ² [363]: 207 (30), 155 (100), 137 (46)	Dimethoxycinnamoyl shikimic acid
16 ^{b,c,d}	265, 366	463 ⁺	MS ² [463]: 287 (100)	Unknown kaempferol derivative
17 ^{b,c}	263, 340	611 ⁺	MS ² [611]: 449 (20), 431 (40), 287 (100)	Kaempferol-3-O-sophoroside
18 ^{a,b,c}	249, 268, 345	519	MS ² [519]: 315 (100)MS ³ [315]: 300 (100)	Isorhamnetin-7-O-(6"-O-acetyl)-glucoside
19	242, 323 301sh	367	MS ² [367]: 191 (100), 173 (10)	5-O-feruloylquinic acid
20	241, 327 305sh	473	MS ² [473]: 311 (100), 293 (20), 179 (45), 149 (30) 947	Dicaffeoyltartaric acid (chicoric acid)
21 ^{a,d}	265, 363	697 ⁺	MS ² [697]: 535 (100), 449 (50), 287 (30)	Kaempferol-7-O-glucosyl-3-O-(6"-malonyl)-glucoside
22 ^d	279, 517	713 ⁺	MS ² [713]: 465 (100), 551 (38), 303 (78)	Delphinidin-3-O-(6"-O-malonyl)-glucoside-5-O-glucoside
23	280, 514	783 ⁺	MS ² [783]: 535 (100), 287(40)	Cyanidin-3,5-di-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
24 ^{b,c,d}	280, 515	535 ⁺	MS ² [535]: 287 (100)	Cyanidin-3-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
25 ^{b,c,d}	277, 525	565 ⁺	MS ² [565]: 317 (100)	Petunidin-3-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
26	279, 516	287 ⁺		Cyanidin
27	280, 516	449 ⁺	MS ² [449]: 287 (100)	Cyanidin-3-O-galactoside
28 ^{*,d}	280, 516	449 ⁺	MS ² [449]: 287 (100)	Cyanidin-3-O-glucoside
29	279, 514	491 ⁺	MS ² [491]: 449 (12), 287 (100)	Cyanidin-3-O-(6"-O-acetyl)-glucoside
30 ^{*,a,b,c}	277, 527	493 ⁺	MS ² [493]: 331 (100)	Malvidin-3-O-glucoside
31 ^d	280, 513	447 ⁺	MS ² [447]: 271 (100)	Pelargonidin-3-O-monoglucuronide
32 ^a	243, 322 301sh	367	MS ² [367]: 191 (80), 173 (100)	4-O-feruloylquinic acid
33 ^{b,c}	267, 366	431	MS ² [431]: 269 (100), 268 (90)	Apigenin-7-O-glucoside
34 ^{b,c,d}	261, 350	463 ⁺	MS ² [463]: 301(100)	Chrysoeriol-3-O-glucoside
35 ^{a,b,c}	251,357	491	MS ² [491]: 329 (100), 311 (5), 293 (95)	Tricin-3-O-glucoside
36	248, 324 301sh	515	MS ² [515]: 353 (100), 335 (30) MS ³ [353]: 191 (100), 179 (50)	1,3-Dicaffeoylquinic acid
37	248, 325 302sh	515	MS ² [515]: 353 (100), 299 (35), 317 (28), 255 (10), 203 (5) MS ³ [353]: 191 (24), 173 (100)	1,4-Dicaffeoylquinic acid
38	248, 323 302sh	515	MS ² [515]: 353 (100), 299 (25), 255 (18), 203 (8) MS ³ [353]: 191 (35), 173 (100)	3,4-Dicaffeoylquinic acid
39 ^{a,d}	256, 351	463	MS ² [463]: 301 (100), 300 (84)	Quercetin-7-O-galactoside
40 ^{a,d}	257, 368	551 ⁺	MS ² [549]: 389 (54), 303 (100)	Quercetin-3-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
41	248,358	475	MS ² [475]: 299 (100)	Kaempferide glucuronide
42 ^{a,b,c}	255, 351	465 ⁺	MS ² [465]: 303 (100), 302 (68)	Quercetin-7-O-glucoside
43 ^{b,c}	255, 351	479 ⁺	MS ² [479]: 303 (100)	Quercetin-7-O-glucuronide
44	229, 325 302sh	515	MS ² [515]: 353 (100), 191 (18) MS ³ [353]: 191 (100), 179 (50), 173 /2), 135 (10)	3,5-Di-caffeoylquinic acid
45	255, 349	505	MS ² [505]: 301 (100)	Quercetin-7-O-(6"-O-acetyl)-glucoside

Tableau i.2 : Les composés phénoliques de *Cichorium intybus* et données UV-vis, MS et MSⁿ
(Carazzone *et al.*, 2013) (suite)

N°	UV λ_{\max} (nm)	m/z	MS ⁿ m/z	Identification
46 ^{b,c,d}	268, 366 318sh	447	MS ¹ [447]: 327 (35), 285 (100), 284 (74), 257 (45), 255 (18)	Kaempferol-7-O-glucoside
47 ^d	262, 361	593	MS ¹ [593]: 447 (43), 285 (100), 257 (25)	Kaempferol-7-O-rutinoside
48	256, 351	609	MS ¹ [609]: 463 (5), 301 (100), 300 (68)	Quercetin-7-O-p-coumaroylglucoside
49 ^d	248, 268, 341	623	MS ¹ [623]: 315 (100)MS ³ [315]: 300 (100)	Isorhamnetin-7-O-neohesperidoside
50	265, 365	535 ⁺	MS ¹ [535]: 449 (35), 287 (100), 286 (38)	Kaempferol-7-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
51	261, 363	463 ⁺	MS ¹ [463]: 286 (20), 287 (100)	Kaempferol-7-O-glucuronide
52	253, 361	549 ⁺	MS ¹ [549]: 463 (14), 301 (100)	Kaempferide-3-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
53 ^{a,d}	261, 364	463 ⁺	MS ¹ [463]: 286 (100), 287 (36)	Kaempferol-3-O-glucuronide
54 ^{a,d}	263,363	625 ⁺	MS ¹ [625]: 449 (100), 287 (8)	Kaempferol-3-O-glucuronide-7-O-glucoside
55 ^{a,d}	249, 268, 342	565 ⁺	MS ¹ [565]: 479 (4), 317 (100) MS ³ [317]: 302 (100)	Isorhamnetin-7-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
56	264, 366	535 ⁺	MS ¹ [535]: 449 (28), 287 (42), 286 (100)	Kaempferol-3-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
57 ⁺	266, 318 300sh	447	MS ¹ [447]: 285 (70), 284 (100), 257 (5), 255 (35)	Kaempferol-3-O-glucoside
58 ^{a,b,c}	269, 374	565	MS ¹ [565]: 521 (40), 317 (100)	Myricetin-7-O-(6"-O-malonyl)-glucoside
59 ^d	264,36	593	MS ¹ [593]: 447 (100), 285 (36), 257 (25)	Kaempferol-7-O-neohesperidoside
60	263, 361	489	MS ¹ [489]: 285 (100), 284 (15)	Kaempferol-7-O-(6"-O-acetyl)-glucoside
61	263, 361	489	MS ¹ [489]: 285 (10), 284 (100)	Kaempferol-3-O-(6"-O-acetyl)-glucoside
62 ^{b,c}	252, 269, 344	477	MS ¹ [477]: 315 (100)MS ³ [315]: 300 (100)	Isorhamnetin-7-O-glucoside
63	251, 269, 342	491	MS ¹ [491]: 315 (100)MS ³ [315]: 300 (100)	Isorhamnetin-7-O-glucuronide

4 Métabolisme des acides hydroxycinnamiques chez la chicorée

4.1 Généralités

Deux acides aminés aromatiques, la phénylalanine et la tyrosine, sont à l'origine de la formation de la plupart des composés phénoliques chez les végétaux. Ils sont eux-mêmes formés à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire, par la voie de l'acide shikimique. Cette voie résulte en une série de réactions plastidiales conduisant à la formation de ces acides aminés aromatiques à partir d'acide chorismique. La désamination de la phénylalanine est une première étape primordiale de la biosynthèse de l'immense majorité des composés phénoliques et conduit, dans un premier temps, à la formation de l'acide cinnamique, molécule non phénolique, à l'origine de la séquence biosynthétique appelée voie des phénylpropanoïdes. Ceci permet, ensuite, la formation des acides hydroxycinnamiques : acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (figure i.38).

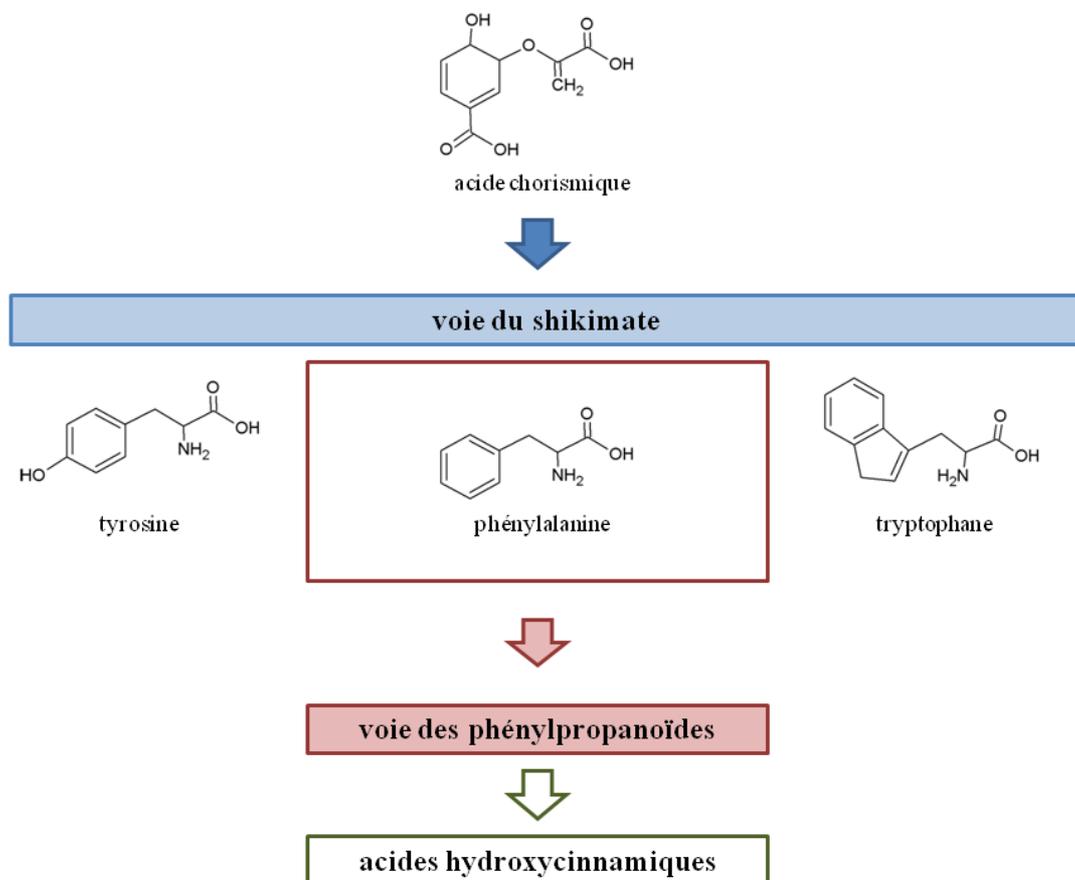


Figure i.38 : Schéma simplifié présentant la synthèse des acides hydroxycinnamiques chez les plantes

Les formes métaboliquement actives des acides hydroxycinnamiques sont leurs esters avec le coenzyme A (CoA) qui permettent d'accéder aux principales classes de composés phénoliques. A partir des esters de CoA, la synthèse s'oriente soit vers les coumarines, par cyclisation intramoléculaire des molécules suivies de modifications complémentaires (glycosylations...) soit vers la formation de phénolamides ou encore d'esters hydroxycinnamiques par estérification des esters de CoA avec un acide alcool comme l'acide quinique. Les plus classiquement rencontrés chez les végétaux sont les acides p-coumaroylquinique ou féruloylquinique et les différents isomères caféoylquiniques dont l'acide chlorogénique.

Deux réductions successives de ces esters de CoA conduisent aux monolignols, ensuite intégrés dans la lignine par polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par l'action de peroxydases ou de laccases. Le coumaroyl-CoA amène à la synthèse des unités H et le feruloyl-CoA vers la synthèse des unités G et S (Whetten *et al.*, 1998).

4.2 La voie de l'acide shikimique

La biosynthèse de nombreux composés phénoliques débute au niveau des acides aminés aromatiques : phénylalanine et tyrosine. Ces acides aminés sont, quant à eux, synthétisés à partir du phosphoénolpyruvate et de l'érythrose-4-phosphate au cours d'une succession de réactions appelée voie de l'acide shikimique. Cette voie est commune aux bactéries, champignons et aux plantes, mais est absente chez les animaux. La synthèse des acides aminés aromatiques débute par la condensation d'une molécule d'érythrose-4-phosphate, qui est produite par la voie oxydative des pentoses phosphates, avec une molécule de phosphoénolpyruvate (PEP) qui provient de la glycolyse (figure i.39). Le glucide (3-déoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate, DAHP) à 7 atomes de carbone qui en résulte subit ensuite une cyclisation puis une réduction qui forme du shikimate d'où la dénomination de la voie. Le chorismate est situé à la bifurcation des voies qui conduisent à la production de phénylalanine et tyrosine en faisant intervenir la chorismate mutase d'une part et le tryptophane *via* l'action de l'antranilate synthase d'autre part. La voie du shikimate est une voie régulée par rétroinhibition. Parmi les enzymes clés de cette voie figure l'aldolase qui catalyse la réaction initiale de condensation et qui est inhibée par les trois produits terminaux. De la même façon, la transformation du chorismate en préphénate est inhibée à la fois par la phénylalanine et la tyrosine, alors que la transformation du chorismate en anthranilate est inhibée par le tryptophane (Maeda et Dudareva, 2012).

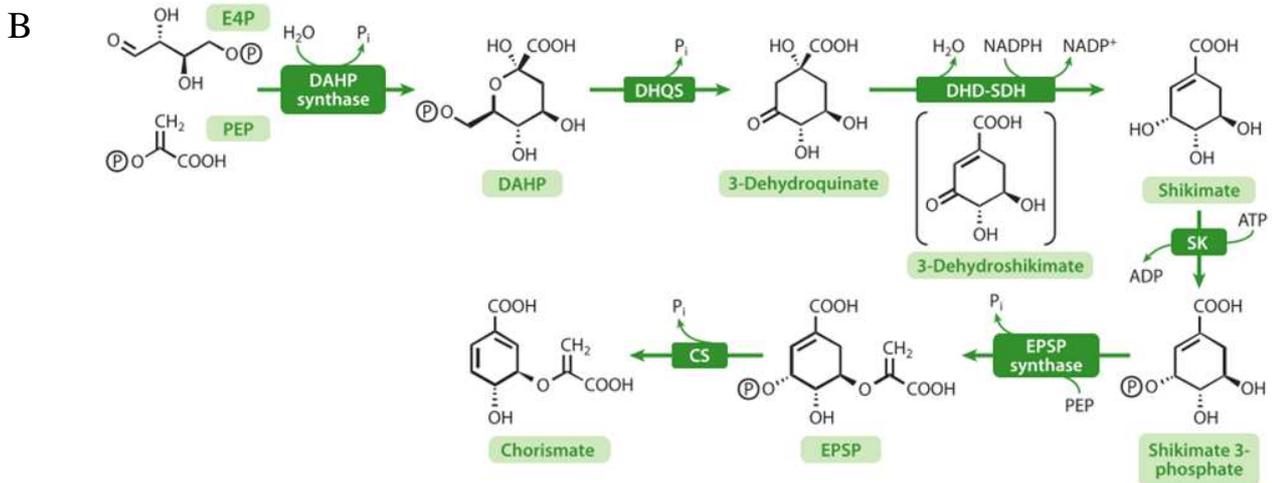
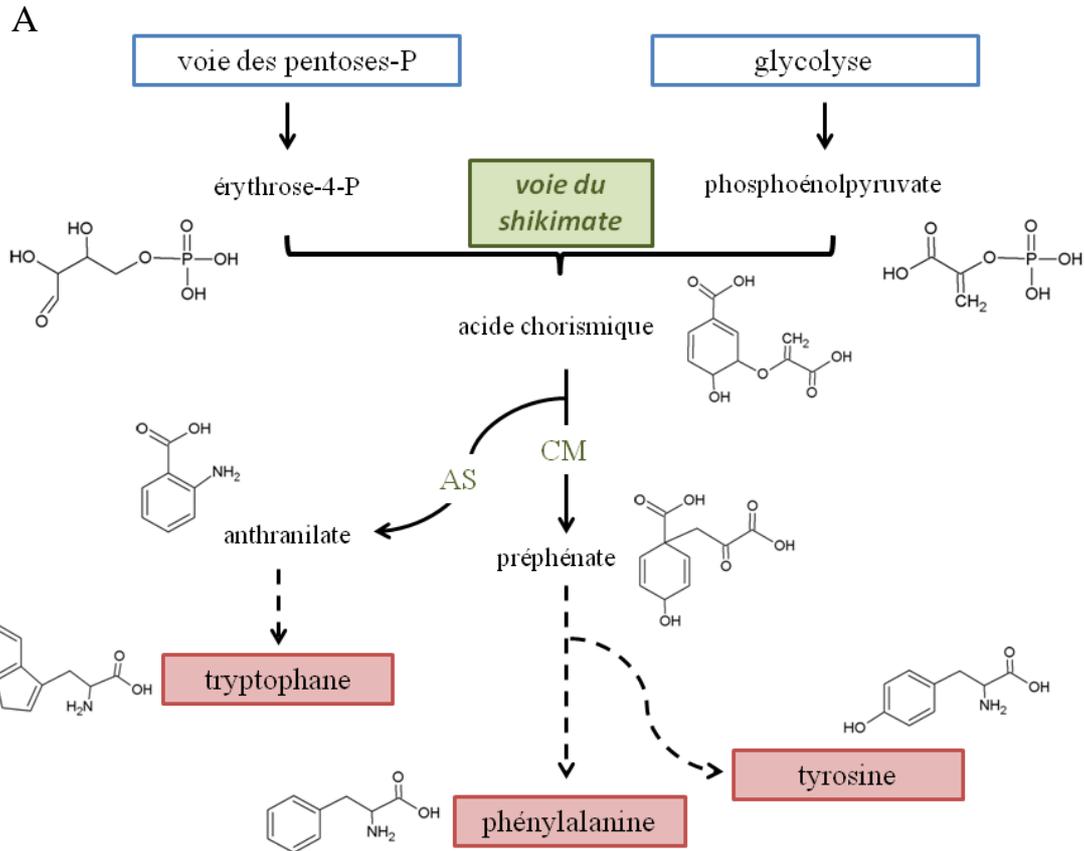


Figure i.39 : Voie de biosynthèse simplifiée de la phénylalanine, de la tyrosine et du tryptophane (A) et voie de biosynthèse de l'acide shikimique d'après Maeda et Dudareva (2012) (B). E4P : érythrose-4-P, PEP : phosphoénolpyruvate, DAHP : 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate-7-P, EPSP : 5-énolpyruvylshikimate-3-P, DHQS : 3-déhydroquinatase, DHD : 3-déhydroquinatase déshydratase, SDH : shikimate déshydrogénase, SK : shikimate kinase, CS : chorismate synthase, AS : anthranilate synthase, CM : chorismate mutase,

4.3 La voie des phénylpropanoïdes

La voie des phénylpropanoïdes mène au coumaroyl-CoA à partir de la phénylalanine et est initiée par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (figure i.40). La PAL fait partie de la famille des ammonia-lyases, enzymes permettant la rupture de liaisons carbone-azote. Ainsi, elle catalyse la formation de l'acide *trans*-cinnamique à partir de phénylalanine. Une augmentation de l'activité de la PAL est corrélée à une production accrue des produits de la voie des phénylpropanoïdes (Ozeki et Komamine, 1985) et a des conséquences sur l'accumulation des composés phénoliques, comme c'est le cas pour l'acide chlorogénique chez le tabac (Bate *et al.*, 1994). Son activité varie en fonction du stade développemental de la plante, du tissu et de l'exposition à divers stimuli (Jones, 1984 ; Shufflebottom *et al.*, 1993). Son expression peut, en effet, être induite par une infection, une blessure, une exposition aux UVs, un stress hydrique ou encore des changements violents de température (Campbell et Ellis, 1992 ; Edwards *et al.*, 1985).

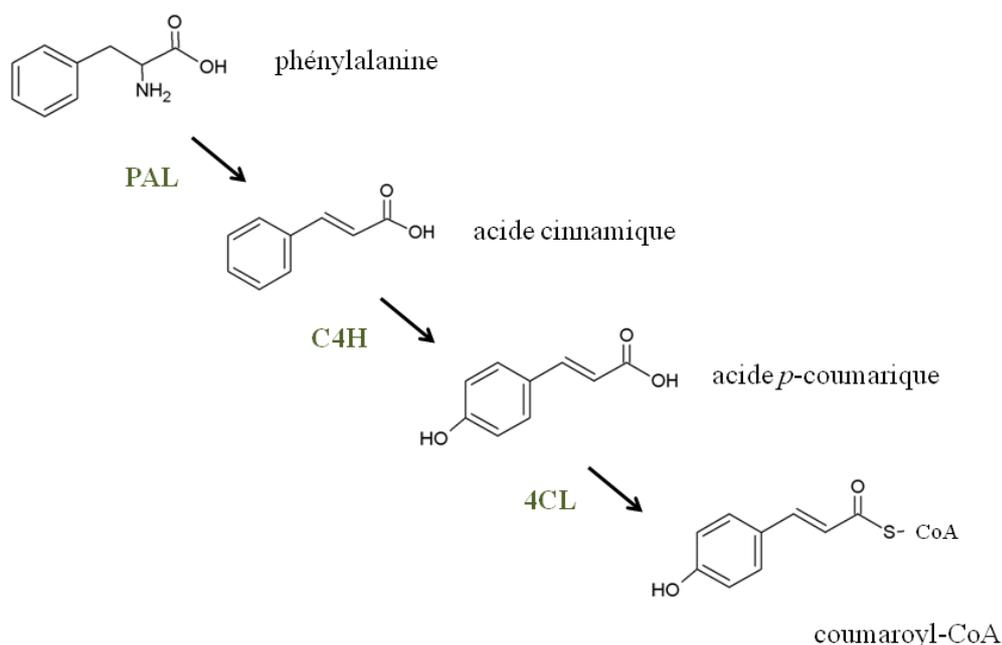


Figure i.40 : Schéma de la voie des phénylpropanoïdes. PAL : phénylalanine ammonia-lyase, C4H : cinnamate 4-hydroxylase, 4CL : 4-coumarate : CoA ligase

Une activité TAL ou tyrosine ammonia-lyase a été mise en évidence chez les Graminées. Chez le maïs, il a été montré *in vitro* que la PAL possédait une activité TAL (Rösler *et al.*, 1997 ; Whetten *et al.*, 1998). Cette réaction de désamination de la tyrosine permettrait d'aboutir directement à l'acide *p*-

coumarique sans passer par l'acide *t*-cinnamique. Cependant, la coexistence des voies de la PAL et de la TAL n'est pas encore totalement comprise *in vivo*.

L'acide *trans*-cinnamique est ensuite hydroxylé par une hydroxylase, la C4H (cinnamate 4-hydroxylase) pour former l'acide *para*-coumarique. Les hydroxylases sont des enzymes difficiles à étudier à cause de leur instabilité, de leur faible teneur ainsi que de leur association aux membranes (Chapple, 1998). C'est une enzyme à cytochrome P450 appartenant à la sous-famille des CYP73 (Teutsch *et al.*, 1993). Elle s'exprime dans des différents tissus tels que la racine, la tige, la fleur et lors de stress (blessure, exposition aux UVs...). Ses profils d'expression sont semblables à ceux de la PAL (Bell-Lelong *et al.*, 1997 ; Mizutani *et al.*, 1997 ; Baucher *et al.*, 1998 ; Koopmann *et al.*, 1999 ; Ro *et al.*, 2001).

Enfin, une dernière étape, catalysée par une CoA ligase permet la formation d'esters de CoA à partir de plusieurs acides hydroxycinnamiques. Ce sont les formes activées de ces acides hydroxycinnamiques. La formation d'hydroxycinnamoyl-CoA, catalysée par la 4Cl (4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase) implique une réaction en deux temps. Dans un premier temps, un composé intermédiaire que l'on nommera acide hydroxycinnamique-AMP (adénosine monophosphate) est formé, accompagné de la libération d'un pyrophosphate. Puis la partie AMP est remplacée par un coenzyme-A (Gross et Zenk, 1974 ; Hu *et al.*, 2010). La 4Cl se trouve aussi stimulée par la blessure, l'élicitation ou l'infection fongique (Baucher *et al.*, 1998). Les profils d'expression se révèlent souvent similaires à ceux de la PAL.

Le coumaroyl-CoA issu de l'activité de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est alors le composé de base pour la formation des dérivés de l'acide caféique.

4.4 Synthèse des dérivés de l'acide caféique

Comme indiqué précédemment, la chicorée accumule quatre composés phénoliques principaux : les acides chlorogénique (CQA), isochlorogénique (diCQA), caftarique (CTA) et chicorique (diCTA) (Carazzone *et al.*, 2013). La voie de biosynthèse de ces composés est loin d'avoir été complètement élucidée. Ce sont des acides hydroxycinnamiques dont le squelette (C6-C3) dérive de l'acide cinnamique. La chicorée est riche en CQA qui est l'association d'un caféoyl-CoA (acide caféique sous sa forme activée) et d'un acide quinique. Cependant elle accumule également de l'acide caféique sous d'autres formes conjuguées. L'acide caféique a une répartition quasi-universelle chez les végétaux. Par contre, les diverses formes conjuguées que l'on peut trouver chez la chicorée sont quant à elles plus originales.

Seule la voie de l'acide chlorogénique est bien caractérisée chez les végétaux. Deux acyltransférases catalysant la formation et l'hydrolyse des acides chlorogéniques ont été découvertes initialement chez l'arabette, le tabac et la tomate : HCT (hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate transférase) chez *Arabidopsis thaliana* L. (Hoffmann *et al.*, 2004) et HQT (hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transférase) chez *Lycopersicon esculentum* Mill. et *Nicotiana tabacum* L. (Niggeweg *et al.*, 2004). Par la suite, elles ont été mises en évidence chez de nombreuses autres plantes. Ces enzymes utilisent le coumaroyl-CoA issu de la voie des phénylpropanoïdes pour produire du *p*-coumaroylquinate ou du coumaroylshikimate (figure i.41). Les dérivés de l'acide coumarique obtenus sont ensuite hydroxylés par la C3H pour produire du caféoylquinate, c'est-à-dire l'acide chlorogénique, ou du caféoylshikimate (Hoffmann *et al.*, 2004 ; Niggeweg *et al.*, 2004 ; Escamilla-Treviño *et al.*, 2014). Les caféoylquinate et caféoylshikimate peuvent également être de nouveau pris en charge par HCT ou HQT pour être dégradés par hydrolyse afin de former à nouveau le caféoyl-CoA (Schoch *et al.*, 2001). Toutes les réactions sont réversibles (Lallemand, 2006). Une nouvelle enzyme a récemment été identifiée chez *Arabidopsis thaliana* : la caféoyl shikimate estérase (CSE). Elle permet, avec l'action conjointe de la 4Cl de passer outre l'étape catalysée par HCT en hydrolysant le caféoylshikimate en acide caféique. Son rôle ne serait pas négligeable dans la biosynthèse de la lignine. En effet, des mutants *cse* chez *A. thaliana* sont caractérisés par des dépôts amoindris en lignine, qui par la même occasion est enrichie en unités H (Vanholme *et al.*, 2013).

L'acide chlorogénique peut ensuite être converti en acide isochlorogénique. Des travaux réalisés chez *Ipomoea batatas* Lam. ont contribué à proposer l'existence d'une chlorogénate : chlorogénate caféoyl transférase (ou isochlorogénate synthase, ICS) transférant le groupe caféoyle d'un CQA vers un autre pour former l'acide dicaféoylquinique, soit le diCQA (Kojima et Kondo, 1985). Si l'enzyme responsable de la synthèse de cet acide a été partiellement caractérisée et purifiée, le(s) gène(s) codant cette protéine ainsi que les agents régulateurs de cette biosynthèse restent à découvrir. Récemment, il a été montré qu'une HCT recombinante de café ou une HQT recombinante de tomate étaient capables, sous certaines conditions, de synthétiser le diCQA *in vitro* (Lallemand *et al.*, 2012 ; Moglia *et al.*, 2014).

Chez la prêle, la synthèse d'acide caftarique (CTA) s'effectue à partir de l'acide tartrique auquel est ajouté un caféoyl-CoA par l'action de la CTT (hydroxycinnamoyl-CoA : *meso*-tartrate hydroxycinnamoyl transférase). Le diCTA est alors obtenu par transfert d'un caféoyl-CoA vers un deuxième CTA par la CCT (hydroxycinnamoyl-CoA : caféoyl-*meso*-tartrate hydroxycinnamoyl transférase) (Hohlfeld *et al.*, 1996). Récemment, il a été mis en évidence chez *Arachis glabrata*, le rôle d'une enzyme, la HTT (hydroxycinnamoyl-CoA : tartrate hydroxycinnamoyl transférase) dans la synthèse de CTA. Le mécanisme biosynthétique est le même que chez la prêle (Sullivan, 2014). Ces

enzymes ont été décrites *in vitro* à partir d'extraits bruts mais aucune caractérisation moléculaire n'a jamais été réalisée.

Les enzymes HCT et HQT font partie d'une grande famille d'acyltransférases appelée BAHD. Ces acyltransférases constituent un large groupe d'enzymes responsables de l'acylation, dépendante des acyl-CoA, de métabolites spécialisés. Cette super-famille d'acyltransférases tient son nom des premières enzymes isolées dans la famille des acyltransférases (**BEAT**, **AHCT**, **HCBT1**, **DAT**) (St Pierre et De Luca, 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, environ 64 acyltransférases de la famille des BAHD ont été identifiées par recherche de similarités de séquences dans les banques de données nucléotidiques, incluant les pseudo-gènes. Cependant seules quelques-unes ont une fonction biochimique identifiée (D'Auria, 2006). Une autre famille d'enzymes est responsable de réactions d'acylation et a des composés phénoliques comme substrats potentiels. Il s'agit de la famille des SCPL (Serine CarboxyPeptidase-Like) acyltransférases. Les BAHD utilisent les esters d'acyl-CoA comme donneurs alors que ce sont les esters d'1-O-glucose pour les SCPL (Bontpart *et al.*, 2015). Dans ce travail, nous nous intéresserons principalement aux enzymes de la famille des BAHD.

Si la synthèse du CQA est bien documentée, celles des diCQA, CTA et diCTA restent parcellaires. Les enzymes CTT, CCT et l'ICS ont été caractérisées sur le plan biochimique, mais aucune identité moléculaire n'a été mise au jour. En effet, les gènes codant ces protéines restent à découvrir. De la même façon, les mécanismes de régulation contrôlant la synthèse de ces quatre polyphénols ne sont que très peu décrits dans la littérature.

Chez la chicorée, aucune caractérisation n'a encore été faite auprès d'enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces acides hydroxycinnamiques, que ce soit d'un point de vue moléculaire, biochimique ou physiologique.

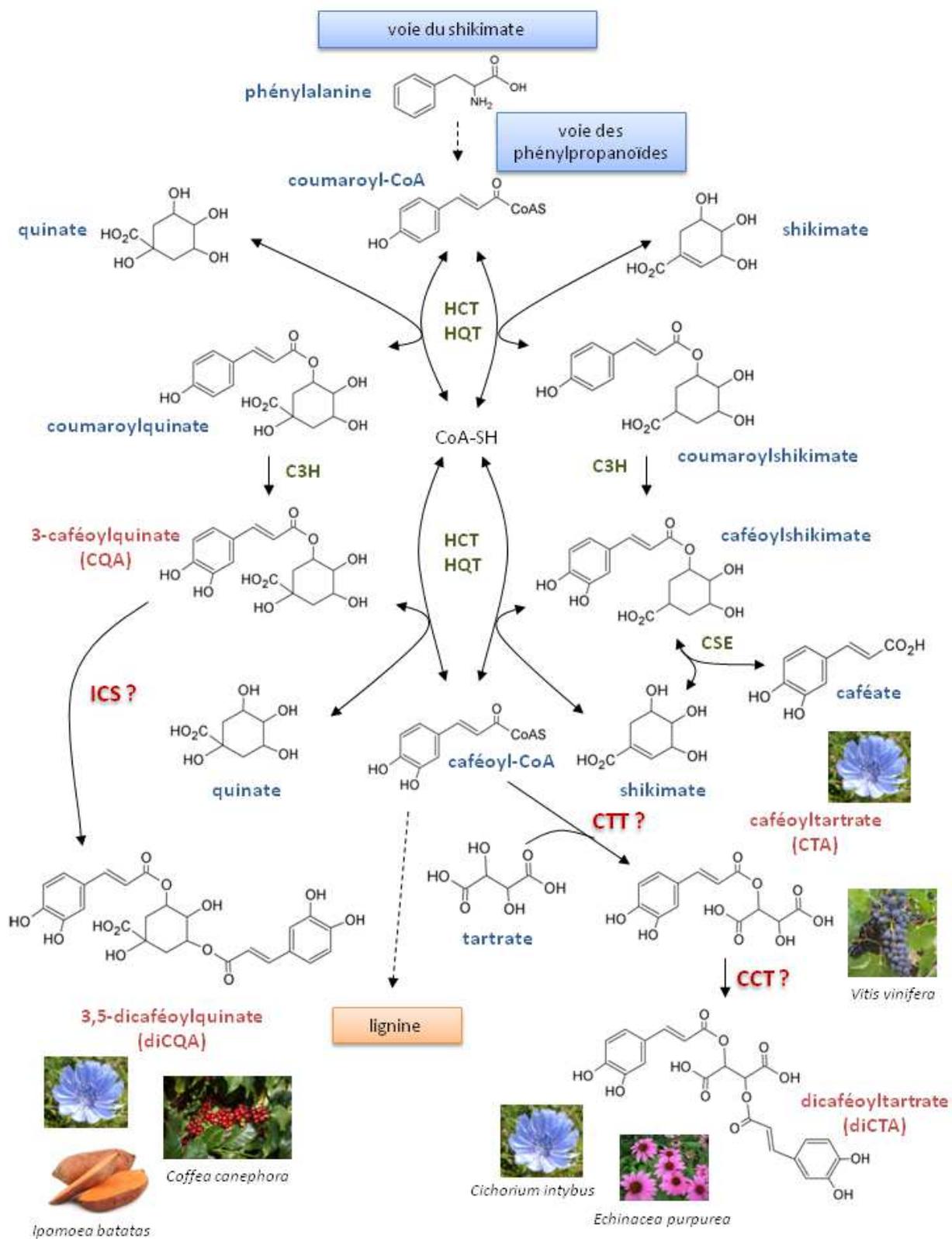


Figure i.41 : Voie de biosynthèse hypothétique des polyphénols de chicorée. HCT : hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quininate transférase, HQT : hydroxycinnamoyl-CoA quininate hydroxycinnamoyl transférase, C3H : *p*-coumaroyl ester 3-hydrolase, CSE : caféoylshikimate estérase, CTT : hydroxycinnamoyl-CoA : *meso* tartrate hydroxycinnamoyl tranférase, CCT : hydroxycinnamoyl-CoA : caféoyl-*meso*-tartrate hydroxycinnamoyl transférase, ICS : isochlorogénate synthase.

Les acides hydroxycinnamiques résultent de l'activité de la voie du shikimate puis de celle des phénylpropanoïdes. La synthèse des composés phénoliques, qui caractérisent la chicorée, a alors comme molécule initiatrice le coumaroyl-CoA. Celui-ci va s'associer au quinate ou au shikimate sous l'action d'enzymes de la famille des acyltransférases, les HCT et HQT. HQT est présente chez les plantes accumulant particulièrement le CQA, telles que le tabac. Ensuite, l'action de la C3H permet d'ajouter une fonction hydroxyle engendrant la production de dérivés de caféoyl-CoA : le CQA et le caféoylshikimate. Les enzymes HCT et HQT étant réversibles à la fois pour les dérivés de caféoyl-CoA et ceux du coumaroyl-CoA, ces composés peuvent être également dégradés.

Le CQA est à l'origine de la production de diCQA par des mécanismes qui ne sont pas encore totalement élucidés. La production de CTA puis de diCTA demande la mobilisation du caféoyl-CoA, entrant en compétition avec des processus importants comme la production de lignine. Ces voies terminales restent, de la même façon, non décrites d'un point de vue moléculaire. Ces zones d'ombre font de l'exploitation de ces produits finaux un enjeu et une requête difficile. Ce projet de thèse se positionne alors dans ce contexte de possibilité de valorisation des molécules de la chicorée dotées de propriétés bienfaitantes.

5 Objectifs de la thèse

Cette étude s'est inscrite dans un contexte de connaissances éparses concernant la voie de biosynthèse des 4 composés phénoliques majoritaires de la chicorée. Mon travail de thèse consistait à décrire la voie de biosynthèse du diCQA et à identifier son (ses) rôle(s) physiologique(s) pour la plante. Comme abordé précédemment, le diCQA est synthétisé à partir du CQA mais l'enzyme responsable de cette étape biochimique est encore inconnue. Cela a été montré chez la patate douce (Villegas *et al.*, 1987).

Les enzymes catalysant la synthèse des CQA, diCQA, CTA et diCTA ont toutes en commun d'utiliser le caféoyl-CoA comme donneur d'acyle. En effet, ces 4 molécules sont des dérivés de caféoyl-CoA. Des travaux récents ont permis d'identifier deux enzymes capables, sous certaines conditions de synthétiser du diCQA : HCT et HQT. HCT est une enzyme ubiquitaire dans le règne végétal, alors que la présence d'HQT est caractéristique des plantes accumulatrices de CQA (Niggeweg *et al.*, 2004). La caractérisation de ces enzymes a été menée chez l'artichaut, espèce de la famille des *Asteraceae*. Une HCT et trois HQT ont été décrites et leur implication dans la synthèse de CQA a été également montrée (Comino *et al.*, 2007, Comino *et al.*, 2009, Sonnante *et al.*, 2010).

L'objectif de cette thèse résidait donc dans l'identification du mécanisme responsable de la synthèse de diCQA et dans la caractérisation biochimique des gènes qui y sont impliqués. Ces informations permettraient de mieux comprendre cette voie biosynthétique et les mécanismes sous-jacents d'accumulation de CQA et de diCQA. Avec une vision plus appliquée, l'identification de ces gènes permettrait d'envisager une synthèse plus aisée et moins coûteuse de diCQA, à des fins cosmétiques et thérapeutiques. Actuellement, cette molécule est produite à l'aide d'un procédé d'extraction à partir de tubercules de patate douce. Ce procédé est connu sous le nom de « plantes à traire ». Le principe est de stimuler la production de composés d'intérêt et de récolter ces substances sans endommager la plante. Un protocole de synthèse chimique en 9 étapes à partir d'acide quinique a également été mis au point en 2011 (Raheem *et al.*, 2011). Ainsi, dans le cas de résultats fructueux dans l'identification génique, la production de diCQA dans des systèmes hétérologues, tels que dans des bactéries, pourra être envisagée.

Dans un premier temps, une partie du travail a consisté à caractériser le matériel végétal et à rechercher des conditions inductrices de la voie de biosynthèse des acides hydroxycinnamiques *in planta*, notamment *via* l'exposition à un stress salin. L'objet de cette approche était d'identifier des conditions pour lesquelles les teneurs en polyphénols pourraient être contrastées. Dans ces

conditions, l'hypothèse était que les variations métaboliques observées pourraient être corrélées à des modifications transcriptionnelles. Ainsi des gènes candidats (effecteurs et régulateurs des voies biosynthétiques) pourront être identifiés par comparaison des transcriptomes. Cette étude sera traitée dans le chapitre 1.

Ensuite, deux leviers d'action ont été privilégiés en parallèle : l'étude des gènes HCT et HQT chez la chicorée (chapitre 2) et la purification de l'isochlorogénate synthase (ICS) chez la patate douce (chapitre 3). Les différentes HCT et HQT de chicorée, à l'origine non décrites, ont été identifiées et caractérisées biochimiquement. Leur implication potentielle dans la synthèse de diCQA a alors été étudiée. Enfin, la purification de l'ICS a été entreprise à partir des travaux de Villegas, travaux qui ont permis de purifier l'isochlorogénate synthase chez cette espèce. Cette étude n'avait pas abouti à une caractérisation moléculaire de l'enzyme (Villegas *et al.*, 1987). La patate douce est un matériel facile à se procurer et nous avons alors bénéficié d'un protocole de purification sur lequel nous avons pu nous appuyer pour nos recherches. Cet axe de travail visait, par une approche de biochimie classique, à identifier des gènes candidats impliqués dans la synthèse de diCQA.

Chapitre 1

**Caractérisation chimique du matériel végétal et
recherche de conditions modulatrices de
l'accumulation des composés phénoliques chez la
chicorée**

La caractérisation des voies de biosynthèse des esters d'acides caféiques chez la chicorée constituait l'objectif de ce travail de thèse. Pour pouvoir explorer les voies de biosynthèse des acides hydroxycinnamiques chez la chicorée, la stratégie envisagée est de mettre en évidence des conditions modulatrices de l'accumulation des quatre polyphénols d'intérêt : les CTA, CQA, diCTA et diCQA. Ces conditions nous offriraient l'opportunité d'établir une confrontation entre plusieurs transcriptomes afin de mettre en évidence des acteurs de la voie de biosynthèse de ces polyphénols. Une première piste a été de mettre au point des systèmes de culture de plantes entières de chicorée ou de simples fragments végétaux et d'induire une accumulation de ces composés par ajouts de précurseurs supposés ou d'éliciteurs. Une deuxième piste a consisté à soumettre les plantes à un stress salin. En effet, comme cela a été décrit en introduction de thèse, la possibilité de l'implication de ces composés dans des mécanismes de défense de la plante face à d'éventuelles attaques de pathogènes est fortement mise en avant.

Matériel et méthodes

1 Matériel végétal et conditions de culture

1.1 Espèce retenue pour l'étude

L'ensemble des expériences a été réalisé sur *Cichorium intybus* L. var. Orchies. Les graines ont été fournies par la société Florimond Desprez (Cappelle-en-Pévèle, F-59). Cette variété obtenue en 1987 est rustique et est la plus cultivée au monde. Elle ne possède pas de sensibilité particulière aux maladies connues. Il s'agit d'une variété synthétique de chicorée industrielle cultivée pour l'exploitation de ses racines.

1.2 Conditions de culture

1.2.1 Test de germination

Les tests de germination sont effectués dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre. Les graines sont placées au contact de deux disques de papier filtre imprégnés de milieu Murashige & Skoog dilué au demi (MS 0,5x tamponné au KOH pH 6 ; annexe I) additionné ou non de différents composés dont on teste l'effet sur la germination (Murashige et Skoog, 1962) (figure 1.1). Cette

concentration du milieu MS a été sélectionnée à la suite d'expériences d'optimisation qui seront exposées dans la partie "Résultats".

Afin d'éviter le développement de champignons, la mise en place des tests a été réalisée sous conditions stériles dans le cas d'ajout de mannitol ou sorbitol dans le milieu MS 0,5x ou lorsque la durée d'expérimentation excédait une semaine. Une méthode de stérilisation en phase gazeuse a été optimisée pour les graines de chicorée. Les graines sont placées pendant 18h, à sec, dans une cloche en verre fermée hermétiquement dans laquelle a été déposé un récipient contenant 50 mL d'eau de Javel commerciale (9,6% de chlore actif) additionnée de 3 mL d'acide chlorhydrique. En parallèle, les disques de papier filtre sont autoclavés. Le test est préparé sous une hotte stérile avec des outils eux-mêmes stériles. Les boîtes de Petri, fermées hermétiquement avec du parafilm, sont ensuite disposées dans une chambre de culture avec une source lumineuse de 5 W.m^{-2} . Les conditions d'éclairement et de température sont de 12h de jour à $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ et 12h de nuit à $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.



Figure 1.1 : Plantules de chicorée âgées de quatre jours cultivées sur papier filtre imbibé de milieu MS 0,5x en chambre de culture. Diamètre de la boîte de Petri = 9 cm.

1.2.2 Culture de plantes en hydroponie

Le système pour les cultures hydroponiques est constitué d'un bac contenant 1 L de solution nutritive MS 0,5x. Cette concentration du milieu MS a été validée par des tests qui seront exposés dans la partie "Résultats". Une plaque de polystyrène trouée est posée sur ce bac. Des mèches de laine de roche sont enfilées dans des microtubes de 1,5 mL dont le fond a été coupé. Ces mêmes tubes sont emboîtés dans les trous prévus sur les plaques de polystyrène. Ainsi, les mèches sont en contact avec le milieu MS 0,5x. Cela permet la remontée par capillarité du liquide. Les graines de chicorée sont placées directement à l'extrémité de la mèche et les boîtes de culture sont disposées en serre. Les conditions d'éclairement et de température sont de 16h de jour à $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ et 8h de nuit à $18 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (figure 1.2).

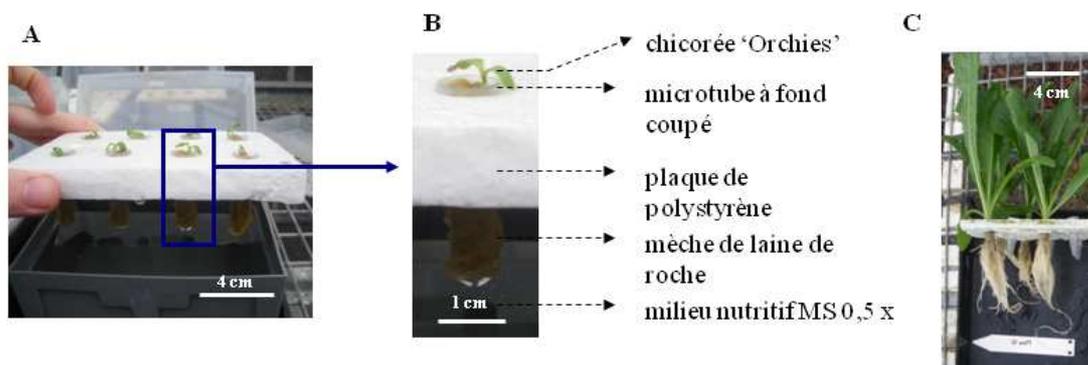


Figure 1.2 : Système utilisé pour la culture en conditions hydroponiques de chicorées.

- A. et B. Plantules âgées de 4 jours.
- C. Jeunes plantes âgées de 30 jours.

1.2.3 Incubation d'explants foliaires

Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes âgées de 4 à 6 semaines cultivées sous conditions hydroponiques comme décrit précédemment. Des disques de 8 mm de diamètre sont découpés dans le limbe de feuilles matures à l'aide d'un emporte-pièce et mis à flotter sur de l'eau distillée pendant 1 h à la lumière. Les disques sont ensuite aléatoirement répartis à raison de 20 unités dans des pots en verre contenant 20 mL de milieu de référence constitué d'acide 2-(N-morpholino)-éthane-sulphonique 5 mM, de KCl 10 mM, de CaCl_2 1,5 mM et ajusté à pH 6 à l'aide de KOH (figure 1.3). Le milieu de référence est additionné de substrats ou effecteurs dont la nature et la concentration seront mentionnées ultérieurement lors de la présentation des résultats. La face des disques en contact avec le milieu n'est pas contrôlée. Il est considéré que cette variable est aléatoire et homogène pour chaque modalité testée. Les pots de verre recouverts d'un couvercle transparent sont disposés dans un incubateur sous agitation constante (30 rpm) et sous lumière continue à 25°C (5 W.m^{-2}).



Figure 1.3 : Système d'incubation d'explants foliaires de chicorée. Barre d'échelle = 6 cm.

Afin d'optimiser la pénétration des molécules exogènes dans les tissus végétaux, les explants foliaires ont parfois été soumis à une infiltration sous vide avant incubation. Avant de déposer les pots dans l'incubateur, ils sont placés dans une cloche en verre dont une ouverture est reliée à une pompe à vide. Ainsi, la dépression engendrée dans l'enceinte provoque l'entrée forcée du milieu d'incubation dans les espaces interstitielles des disques, il y a remplacement de l'air par le liquide d'incubation.

1.2.4 Incubation de plantules sur microplaques

Les plantules utilisées pour ces manipulations proviennent de semis en boîte de Petri sur du papier filtre imbibé de milieu MS 0,5x. Après 4 jours de germination, elles sont transférées sur microplaques. Les racines des plantules sont au contact de 350 μ L de milieu MS 0,5x. Les plaques sont par la suite déposées en chambre de culture sous lumière continue à 25°C (5 W.min⁻¹). Après 4 jours de culture sur microplaque, le contenu des puits est remplacé par du milieu MS 0,5x additionné de substrats dont on veut tester l'effet. Leur concentration et leur nature seront décrites ultérieurement.

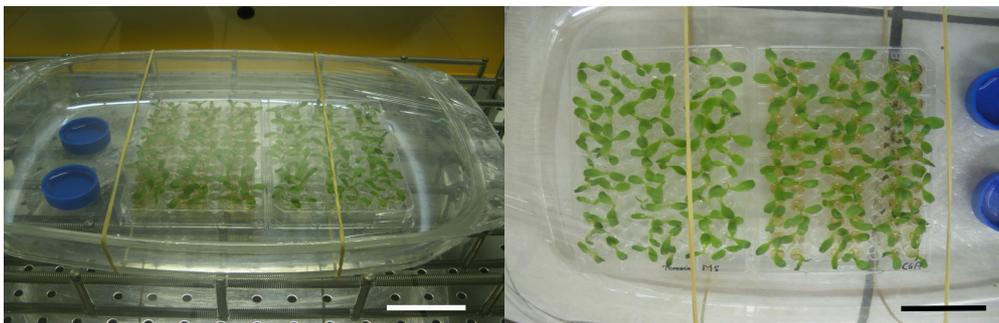


Figure 1.4 : Système d'incubation de plantules de chicorée sur microplaques. Barre d'échelle = 3,2 cm.

1.3 Application de traitements

1.3.1 Traitements salins ou osmotiques

Cas des tests de germination : Dans le but d'appliquer un stress salin ou osmotique aux graines en germination, le milieu MS 0,5x utilisé est enrichi en NaCl selon des concentrations allant de 0 à 500 mM. Dans certains tests, le NaCl a été substitué par du KCl, du mannitol ou encore du sorbitol. Ces

deux derniers constituants sont ajoutés au milieu avec des concentrations doubles par rapport au NaCl ou KCl. En effet, dans ces proportions, les concentrations seront osmotiquement équivalentes dans chaque condition et les effets du stress osmotique seront comparables.

Pour les manipulations sous conditions stériles, les différents milieux testés sont soumis à l'autoclavage. La durée de ces traitements sera indiquée lors de la présentation des résultats.

Cas des cultures hydroponiques : L'application de traitements salins pour les cultures hydroponiques consiste simplement à changer les milieux de culture, c'est-à-dire à permuter le milieu MS 0,5x simple, qui a favorisé le développement préalable des plantes, en un milieu MS 0,5 x contenant du NaCl (0 ; 25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 mM). L'application du stress à des plantes âgées de 4 semaines est alors brutale, assimilable à un choc. La durée des traitements salins appliqués sera précisée dans la section résultats.

1.3.2 Enrichissement du milieu en précurseurs potentiels des synthèses des différents composés phénoliques

Cas des explants foliaires : Les disques foliaires sont soumis à des traitements de 24 h, à l'exception de la manipulation visant à suivre l'évolution des teneurs en polyphénols au cours du temps. A la solution nutritive, sont ajoutés les précurseurs métaboliques potentiels des composés dont on souhaite élucider la biosynthèse. Ainsi, le CQA et l'acide tartrique ont été testés par cette méthode à des concentrations de 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 3 et 5 mM pour le premier et 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mM pour le second (pH ajusté à 6 avec du KOH).

Cas des plantules sur microplaques : Les milieux déposés dans les puits sont enrichis en précurseurs à différentes concentrations. L'ajout de CQA a été testé à 1 mM, l'acide tartrique et la phénylalanine à des concentrations de 0,25 ; 0,5 et 1 mM.

1.3.3 Elicitation des explants foliaires par le méthyljasmonate

Les disques sont soumis à des traitements au méthyljasmonate (MeJA) à la concentration de 50 μ M sur des durées d'incubation allant jusqu'à 72h. Le MeJA est solubilisé dans l'éthanol, les milieux sans MeJA ont donc été complétés avec un volume équivalent en éthanol. Les prélèvements sont réalisés en triplicata.

2 Test de germination : expression des résultats

L'impact des différents traitements subis par les graines de chicorée est évalué par le relevé du nombre de graines germées en fonction du temps. Une graine est considérée comme germée lorsqu'il y a percée des téguments par la radicule et que la radicule est visible. Une difficulté à prendre en compte dans certaines analyses est que les restes de la graine sont solidaires de la plantule jusqu'à 4 jours environ. A cette date, certains de ces restes commencent à être éjectés. Cela peut impliquer des soucis de comparaison notamment à cause d'une différence de masse vis-à-vis de plantules plus jeunes, des différences de composition chimique induites par cette perte de matériel... (figure 1.5).

Le logiciel Germinator a été utilisé afin de calculer les paramètres relatifs à la germination (Joosen *et al.*, 2010). Ces paramètres sont le pourcentage maximal de germination (Gmax), le temps nécessaire pour atteindre 50% de germination (t_{50}) et le temps correspondant à l'intervalle 25% - 75% de graines germées ($U_{75/25}$). Ce dernier traduit l'homogénéité du processus germinatif.

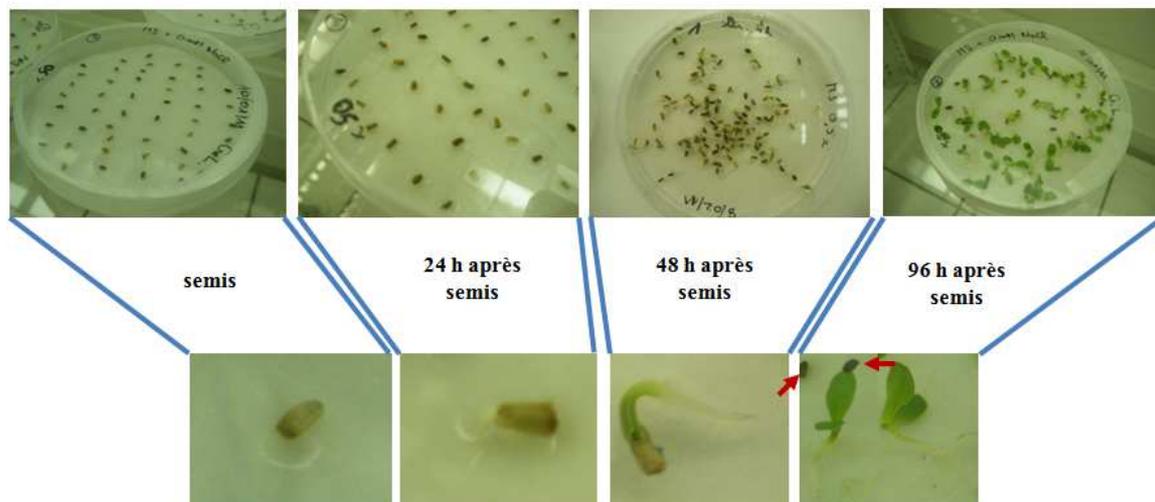


Figure 1.5 : Graines de chicorée à différents stades de germination.

A 1 jour, on parle déjà de graines germées car il y a percée des téguments par la radicule.

A 4 jours, deux cas se présentent : des plantules désolidarisées des téguments ou non (les restes de la graine sont indiqués par une flèche).

Longueur d'une graine = env. 3 mm.

3 Analyse métabolique

3.1 Prélèvement et conditionnement du matériel végétal

Le matériel végétal est prélevé (explants foliaires, plantules ou plantes adultes), rincé plusieurs fois à l'eau distillée et séché à l'aide de papier filtre. Dans le cas du prélèvement des plantes adultes, le système aérien est séparé du système racinaire. Après détermination de la masse de matière fraîche, le matériel végétal est stabilisé par immersion dans l'azote liquide puis lyophilisé pendant 48 h. Les échantillons lyophilisés sont pesés (détermination de la masse de matière sèche) puis broyés à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre végétale sèche ainsi obtenue est conservée à -80 °C.

3.2 Extraction des solutés

Les composés phénoliques ainsi que la proline libre ont été extraits selon un même procédé. Une masse connue de matière végétale sèche et pulvérisée est mise en suspension dans une solution de méthanol / eau ultra-pure / acide acétique (75/23/2, v/v/v). Un rapport de 1 mL d'extractant pour 100 mg de matière sèche est adopté. Les tubes sont incubés pendant 18 h à 4°C sous agitation et à l'obscurité. L'homogénat est centrifugé (14000xg, 10 min, 4°C) et le surnageant est récupéré. A 400 µL de surnageant sont ajoutés 200 µL de chloroforme et 200 µL d'eau ultra-pure. Après agitation vive, les tubes sont centrifugés (14000xg, 10 min, 20°C) et la phase polaire supérieure est récupérée. L'extrait méthanolique est ensuite filtré (0,45 µm). Le filtrat est stocké à -20 °C en attente de l'analyse des composés phénoliques par HPLC-UV et de la proline par colorimétrie.

3.3 Détermination quantitative des composés phénoliques

Les 4 composés phénoliques d'intérêt sont dosés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Plusieurs méthodes chromatographiques ont été utilisées. En effet, des améliorations successives du gradient de solvants ont été apportées pendant la durée de la thèse et des adaptations aux différentes colonnes utilisées ont été entreprises dans le but de réduire la durée du gradient d'élution ou d'améliorer la résolution chromatographique des composés.

Une première méthode a été développée au laboratoire par Mathieu Vanderriele (rapport M2 - 2011) (méthode 1, figure 1.6). 2,5 µL d'extrait méthanolique sont injectés sur une colonne (Merck Licrospher RP18 ; 250 x 4 mm, 4 µm) précédée par une pré-colonne constituée de la même matrice

(LiChroCART Licrospher ; 4 x 4 mm, 5 μ m). L'élution est réalisée en appliquant un gradient binaire (débit 1,2 mL.min⁻¹) à la colonne chauffée à 40°C. Le solvant A correspond à de l'eau ultra-pure additionnée de 0,1% (v/v) d'acide orthophosphorique et le solvant B à de l'acétonitrile contenant 0,1% (v/v) d'acide orthophosphorique. Cette méthode a été utilisée pour la caractérisation des contenus en composés phénoliques dans les plantes de chicorée soumises à des stress ou dans les cas d'incubation des disques ou plantules.

Une deuxième méthode a été mise au point pour une autre colonne (Phenomenex Kinetex pFp ; 100 x 4,6 mm ; 2,6 μ m) précédée d'une précolonne (Phenomenex SecurityGuard Kit) (méthode 2, figure 1.6). Cinq μ L d'extrait sont injectés. L'élution est réalisée à 45°C en appliquant un gradient ternaire délivré avec un flux de 1,1 mL.min⁻¹. Le solvant A correspond à de l'eau ultra-pure, le solvant B à du méthanol et le solvant C à de l'acétonitrile. Dans ces trois solvants, est ajouté de l'acide orthophosphorique à la concentration de 0,1% (v/v). Cette méthode a été utilisée pour l'analyse des contenus en polyphénols sur disques foliaires.

Enfin, une troisième méthode a été mise au point (méthode 3, figure 1.6). Elle est similaire à la méthode 2, mais, dans ce cas, les solvants ne sont pas complétés avec de l'acide phosphorique mais avec de l'acide formique et le gradient a été modifié. Cette méthode a permis une meilleure séparation des acides chlorogénique, néochlorogénique et caftarique.

Les composés phénoliques sont identifiés et quantifiés en référence à des solutions standards de composés phénoliques.

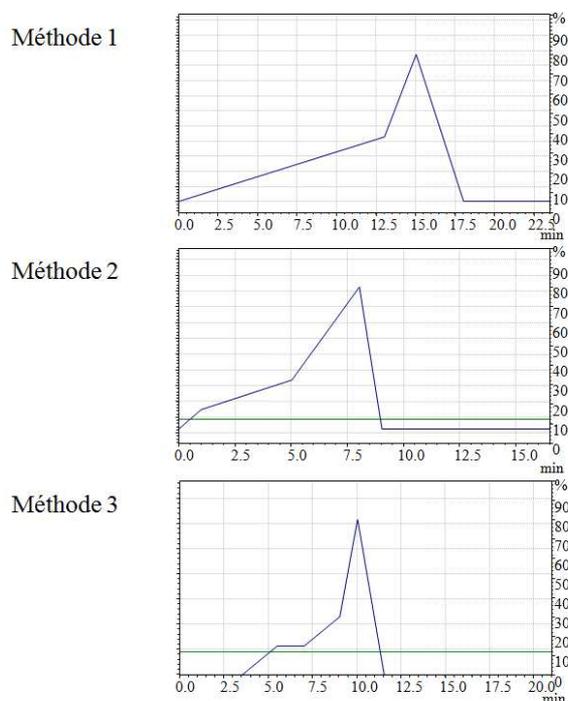


Figure 1.6 : Gradients d'élution des 3 méthodes de séparation utilisées en HPLC.

Temps d'analyse : 23,5 min (méthode 1) ; 16,5 min (méthode 2) ; 21 min (méthode 3) ; solvant B en bleu, solvant C en vert.

3.4 Détermination quantitative de proline par colorimétrie

La méthode de quantification de la proline est tirée des travaux de Troll et Lindsley (1955) et modifiée par Leport (1992). A 50 μL d'extrait méthanolique est ajouté 1 mL de réactif à la ninhydrine (1%, m/v) préparé dans de l'acide acétique à 60% (v/v). Après agitation vive, les tubes sont bouchés à l'aide d'une bille d'agate et placés au bain-marie à 98°C pendant 30 min. Par la suite, les tubes sont refroidis dans de la glace pilée. Afin d'extraire le chromogène, 3 mL de toluène sont ajoutés et les tubes sont bouchés et agités fortement pendant 30 s. Après incubation des tubes à l'obscurité pendant 2 h, l'absorbance des phases organiques (phases supérieures) est lue à 520 nm. L'étalonnage est réalisé en remplaçant l'extrait par des solutions de proline de concentrations croissantes.

3.5 Expression des résultats

Les mesures de masse fraîche, masse sèche ainsi que les analyses de contenus en métabolites ont été réalisées au moins en *triplicata*. Les déterminations quantitatives sont effectuées en *quadriplicata* pour les expériences réalisées sur des plantes cultivées en hydroponie, chaque échantillon étant constitué du prélèvement réalisé de façon aléatoire d'une seule plante. Pour les expérimentations impliquant des disques ou des plantules cultivées sur microplaque, les analyses sont effectuées en *triplicata*, chaque échantillon étant constitué du prélèvement de 20 disques foliaires ou de 24 plantules. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne des répétitions, à laquelle est associé l'écart-type. Ils sont exprimés en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ MS (g de matière sèche). Dans le cas de l'incubation des disques foliaires dans des milieux enrichis en CQA, les résultats sont présentés en concentrations internes (mM interne). Dans certains cas, des tests statistiques (Anova) ont été réalisés à l'aide du logiciel Rcommander.

Résultats

1 Caractérisation des contenus en composés phénoliques chez la chicorée

1.1 Optimisation de la culture de chicorée en hydroponie

L'hydroponie est une technique de culture hors sol qui utilise des solutions nutritives et un substrat inerte dans l'objectif de se passer du support et des apports d'un sol. L'intérêt de l'hydroponie réside en partie dans le contrôle total des conditions de développement des plantes en s'affranchissant des aléas météorologiques et de la variabilité pédologique. Cette technique est rigoureuse d'un point de vue scientifique et permet alors de diminuer la variabilité imputable aux conditions de culture classiques. Cette technique permet également de récupérer de la matière racinaire intacte et propre, ce qui constitue un avantage expérimental. De plus, ce mode de culture facilite la mise en place d'expérimentations visant à exposer la plante à des modifications de sa solution nutritive.

La culture a été mise au point sur mèches de laine de roche comme substrat inerte et irriguée d'une solution Murashige and Skoog (dit MS) apportant sels minéraux et nutriments essentiels à la plante (voir composition milieu MS, annexe I). Au début de cette thèse, aucune information n'était disponible concernant les conditions optimales de culture de la chicorée sous conditions hydroponiques. C'est pourquoi, plusieurs concentrations du milieu MS ont été testées et leurs effets sur la croissance des plantes ont été évalués. La mesure de la production de masse sèche par les plantes a permis d'évaluer ces effets.

Des graines sont mises à germer directement sur le système hydroponique avec du milieu MS non dilué (MS 1x), dilué au demi (MS 0,5x) ou au dixième (MS 0,1x). Les plantes âgées de 3 semaines sont prélevées. Les parties aériennes sont séparées des parties racinaires et les tissus végétaux sont fixés dans l'azote liquide et lyophilisés avant d'être pesés. La production de biomasse apparaît dépendante de la concentration du milieu MS (figure 1.7 - A). La croissance est plus importante lorsque les plantes sont cultivées sur le milieu MS 0,5x. Sur milieu MS 0,1x et MS 1x, la biomasse est réduite de 58 % ou 59 % respectivement en comparaison avec les plantes cultivées sur milieu MS 0,5x. Cette diminution est apparente au niveau des feuilles et des racines chez les plantes cultivées sur milieu MS 1x alors que celle-ci est surtout visible au niveau des feuilles chez les plantes cultivées sur milieu MS 0,1x. Ceci se traduit par une augmentation du rapport feuilles/racines pour les plantes

cultivées sur milieu MS 1X et une diminution de ce rapport pour les plantes cultivées sur le milieu MS 0,1x (figure 1.7 - B)

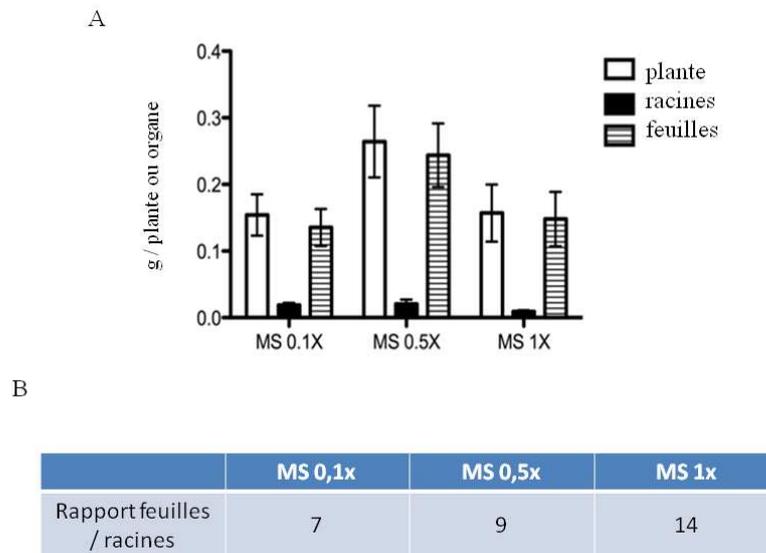


Figure 1.7 : Quantité de matière sèche par plante ou par organe (A) et rapport entre la matière sèche des parties aériennes et la matière sèche des parties racinaires (B) des plantes de chicorée âgées de 3 semaines cultivées sur du milieu nutritif MS à différentes concentrations.

Le milieu MS 0,1x ne semble apparemment, pas apporter suffisamment de nutriments pour une croissance optimale des chicorées. Les plantes se trouvent dans ce cas en état de carence nutritionnelle. Le milieu MS 1x, au contraire, se caractérise par un excès en apport de nutriments et une certaine toxicité. Cette toxicité qui se traduit par une diminution de la croissance peut être liée à des déséquilibres ioniques. En effet, une augmentation de l'apport en nutriments stimule la croissance de la plante et en parallèle diminue les risques de développement de maladies. Mais cette tendance change à partir d'un optimum d'apport en nutriments (figure 1.8) (Marschner, 2012).

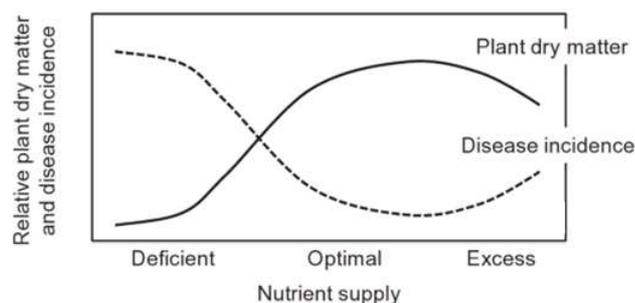


Figure 1.8 : Présentation schématique de la relation entre un apport croissant en nutriments, le développement de la plante et la susceptibilité d'infection de la plante (Marschner, 2012).

Même si un ajustement plus fin de la concentration optimale du milieu MS aurait pu être effectué, nous avons considéré qu'un milieu simple MS 0,5x était satisfaisant pour la culture des plantes dans la suite de nos investigations. Ce milieu sera également utilisé pour les tests de germination de graines de chicorée et d'*Arabidopsis* sur boîtes de Petri. Ces conditions de culture sont retrouvées assez couramment dans la littérature. Des chercheurs étudiant le développement de plantules d'*A. thaliana* utilisent notamment un tel milieu (Bhuwaneshwar *et al.*, 2009).

1.2 Répartition tissulaire des composés phénoliques

Les polyphénols peuvent présenter une distribution originale dans la plante et cela est souvent associé à leur rôle présumé dans la défense du végétal. L'hypothèse émise par Rhoades, concernant ces composés de défense, est la suivante : « A l'intérieur d'un organisme, les défenses sont localisées de façon proportionnelle au risque du tissu particulier et de la valeur de ce même tissu en terme de gain en fitness et inversement proportionnelle au coût de défense de ce tissu en particulier » (Rhoades, 1979). De même, leur concentration et leur identité peuvent varier selon l'âge de la plante.

Quatre acides phénoliques sont connus pour être produits et accumulés chez la chicorée industrielle. Il s'agit des acides chlorogénique (acide 3-caféoylquinique, CQA), isochlorogénique (acide 3,5-dicaféoylquinique, diCQA), caftarique (acide caféoyltartrique, CTA) et chicorique (acide dicaféoyltartrique, diCTA) (Heimler *et al.*, 2007). Alors que la majorité des résultats quantitatifs trouvés dans la littérature concerne des plantes âgées, notre étude concerne des plantes très jeunes. Nous avons donc dans un premier temps réalisé le descriptif qualitatif et quantitatif des composés phénoliques présents dans des jeunes plants de chicorée. Des extraits hydroalcooliques ont été obtenus à partir de feuilles et de racines de chicorées âgées de 4 semaines. Les extraits ont été caractérisés par chromatographie (figure 1.9). Sur le plan qualitatif, aucune différence n'est apparente entre un extrait de racines et un extrait de feuilles. Dans les feuilles, le CQA, le CTA et le diCTA sont les composés les plus représentés. Le diCQA est présent à l'état de traces. Dans les racines, le CQA et le diCQA sont les composés majeurs. Les 2 esters d'acide tartrique sont détectés mais les pics sont de très faibles intensités.

Plusieurs isomères des CQA et diCQA existent et sont décrits dans la littérature. L'artichaut possède, par exemple, les 1-, 3-, 4- et 5-CQA et les 1,5-, 3,4-, 3,5- et 4,5-diCQA (Schütz *et al.*, 2004). Chez *C. intybus*, 3 isomères de CQA ont été identifiés : les 3-, 4- et 5-CQA (Carazzone *et al.*, 2013). D'autres travaux ont identifiés le 5-CQA comme acide caféoylquinique majeur chez cette espèce (Papetti *et al.*, 2008 ; Zawirska-Wojtasiak *et al.*, 2014), ce qui est en désaccord avec les résultats d'identification

obtenus au laboratoire (observation effectuée avec H. Willeman et P. Hance). Il semble que ces erreurs soient en lien avec des changements de nomenclature des acides chlorogéniques (figure 1.10). Nous nous sommes alors rendus compte que l'acide caféoylquinique majoritaire chez la chicorée était en réalité le 3-CQA c'est à dire l'acide chlorogénique et que le 5-CQA ou acide néochlorogénique était très minoritaire.

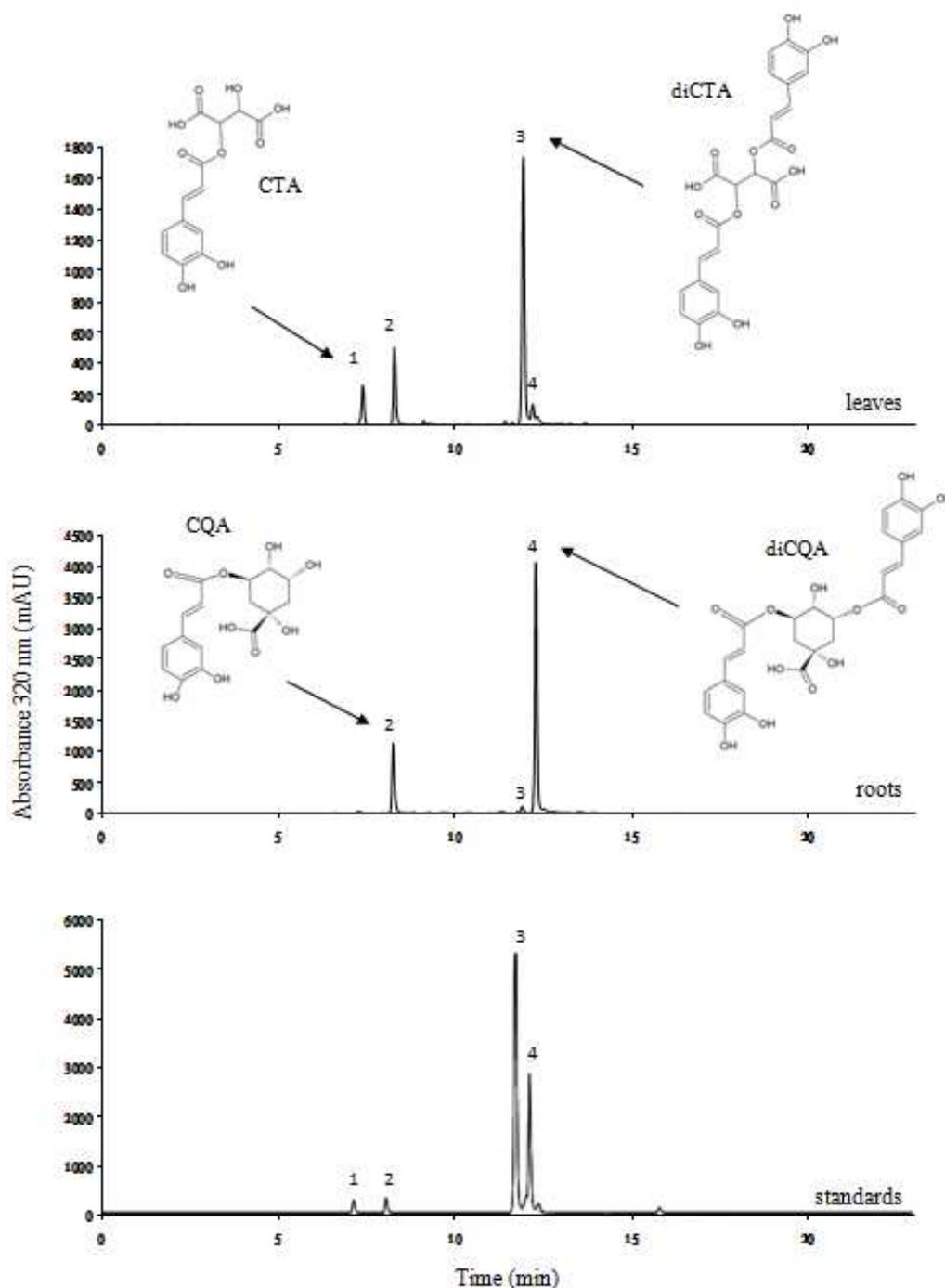


Figure 1.9 : Chromatogrammes d'extraits méthanoliques de feuilles et de racines de chicorée ainsi que d'un mélange de standards. Les produits ont été caractérisés par leurs temps de rétention et leurs spectres d'absorption enregistrés par détecteur à barrettes de diodes. 1. CTA ; 2. CQA ; 3. diCTA ; 4. diCQA.

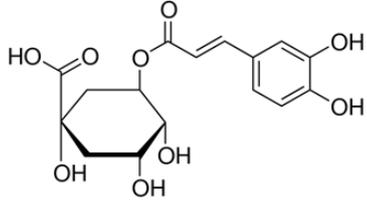
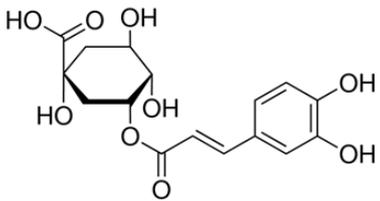
	acide chlorogénique	acide néochlorogénique
synonymes (liste non exhaustive)	acide 1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylique, acide 3-(3,4(dihydroxycinnamoyl)quinique, acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique	acide 5- <i>O</i> -(trans-3,4-dihydroxycinnamoyl)-D-quinique, acide trans-5- <i>O</i> -caféoylquinique
numéro CAS	327-97-9	906-33-2
numéro EC	206-325-6	212-997-1
formule		

Figure 1.10 : Comparaison des acides chlorogénique (3-*O*-caféoylquinique) et néochlorogénique (5-*O*-caféoylquinique). Le numéro CAS d'une substance chimique est son numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données du Chemical Abstracts Service (CAS), division de l'American Chemical Society (ACS). Le numéro EC correspond à l'identifiant unique assigné à une substance chimique par les autorités de l'Union Européenne.

Cette observation nous a poussés à affiner notre méthode d'analyse chromatographique. En effet, les temps de rétention des 5-CQA et CTA sont beaucoup trop proches avec cette méthode d'analyse. Ainsi, nous étions amenés à penser que les quantifications de CTA effectuées dans les analyses traitées dans cette partie étaient finalement à manipuler avec précaution. En effet, la quantification du CTA pouvait potentiellement être surestimée du fait de la présence de 5-CQA. Une nouvelle méthode plus résolutive a donc été mise au point et celle-ci a permis la séparation plus fine et précise de l'ensemble des polyphénols sur feuilles et racines de chicorée (méthode 3, §1.3.3, figure 1.6). Il est alors clairement visible que le CTA est bien le composé majoritaire dans les feuilles et que le 5-CQA est seulement présent à l'état de traces dans les échantillons analysés (figure 1.11). Des traces de 5-CQA semblent également être décelables dans les racines alors que le CTA semble difficilement identifiable. Cette zone chromatographique est compliquée et mériterait l'élaboration d'une méthode au temps d'analyse plus long. Les spectres d'absorption permettent de distinguer les différents produits lorsque les quantités sont suffisantes. La figure 1.12 regroupe les informations permettant la distinction des 3 polyphénols, CTA, 5-CQA et 3-CQA, aux temps de rétention proches. Ainsi, les résultats ayant été obtenus avec une méthode insuffisamment résolutive, la dénomination CTA/5-CQA (acide caftarique / acide 5-caféoylquinique) sera adoptée pour la suite de cet écrit car leurs pics respectifs sont à l'état de traces dans certains cas et sont alors difficilement distinguables. Néanmoins, dans les feuilles, la quantification CTA/5-CQA pourrait se résumer à celle du CTA au vu de la figure 1.11.

Enfin, lorsque l'acide chlorogénique ou CQA sera mentionné, il s'agira bien de l'acide 3-O-caféoylquinique.

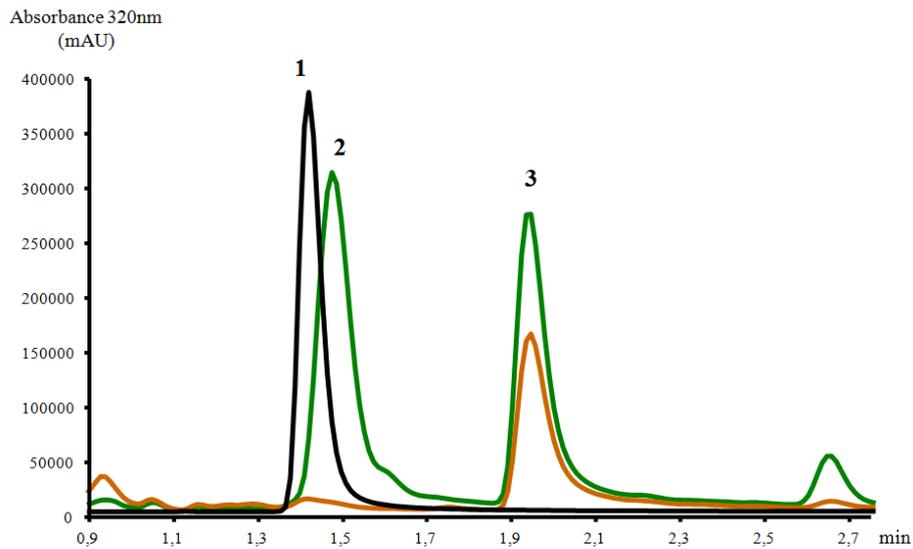


Figure 1.11 : Chromatogrammes d'extraits méthanoliques de feuilles (en vert) et de racines (en marron) de chicorée et d'une solution de 5-CQA commercial (en noir). 1. 5-CQA ; 2. CTA ; 3. 3-CQA.

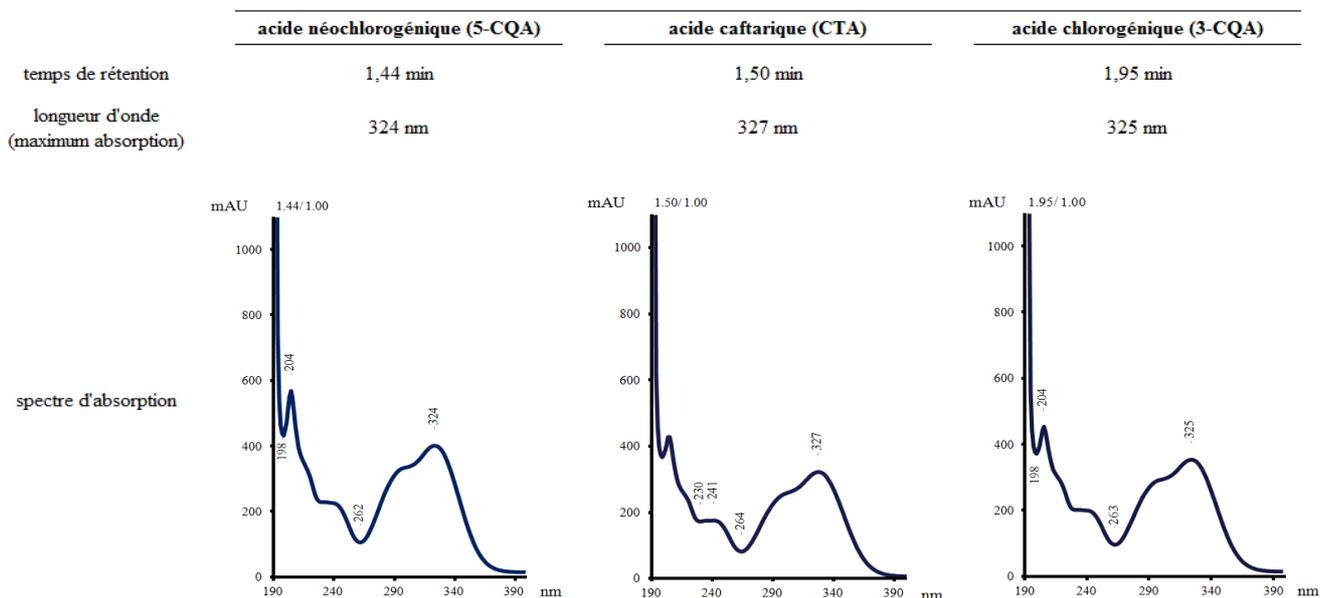


Figure 1.12 : Caractéristiques d'identification des 3-CQA, 5-CQA et CTA de chicorée lors d'analyses par HPLC : temps de rétention (en min), spectre d'absorption et maximum d'absorption (en nm).

Quantitativement, des différences nettes existent lors que l'on compare les teneurs des racines et celles des parties aériennes (figure 1.13). La teneur en CQA est à peu près équivalente dans les feuilles et dans les racines, alors que celle en diCQA est très nettement supérieure dans les racines. En moyenne, la teneur en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de MS de diCQA est 20 fois plus élevée dans les racines que dans les feuilles. A l'inverse, les esters d'acide tartrique (CTA et diCTA) sont beaucoup plus abondants dans les feuilles que dans les racines. En moyenne, la teneur en CTA/5-CQA y est 45 fois plus élevée et celle de diCTA, 95 fois plus forte dans les feuilles que dans les racines.

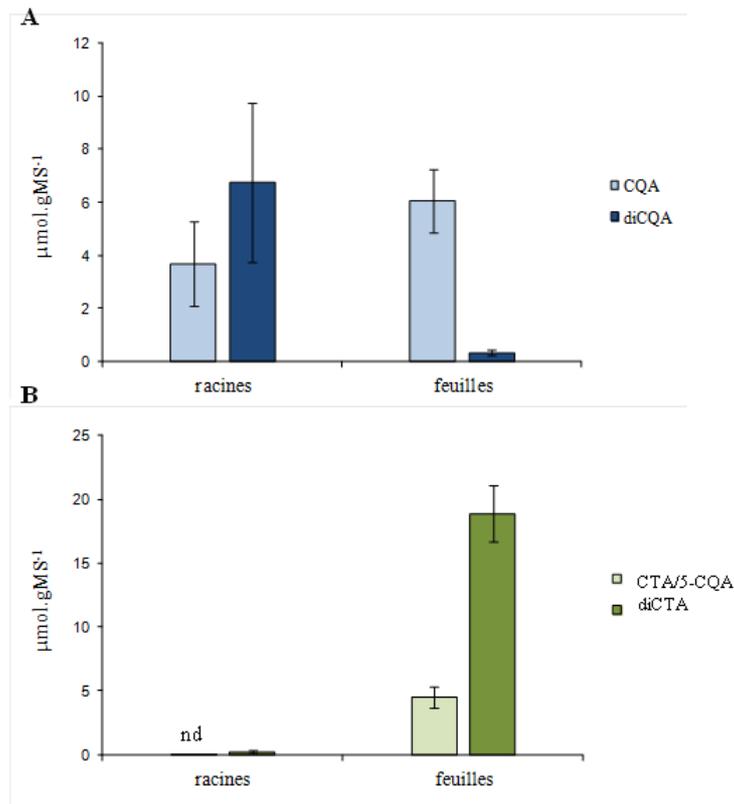


Figure 1.13 : Teneurs en esters d'acide caféique des racines et des parties aériennes de plantes de chicorée âgées de 4 semaines. A : teneurs en CQA et diCQA, B : teneurs en CTA/5-CQA et diCTA. nd : non détecté.

1.3 Evolution des teneurs en composés phénoliques au cours du développement des plantes

Les organes de chicorée présentent une signature métabolique originale. Pour la suite, nous nous sommes intéressés aux évolutions des teneurs en polyphénols au cours du développement de la plante.

Dans un premier temps, des graines ont été mises à germer et prélevées 1 jour et 2 jours après imbibition et les teneurs des composés phénoliques ont été mesurées (figure 1.14). Dans les graines

sèches, les composés phénoliques majeurs sont le CQA ($4,5 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$) et le diCQA ($6,4 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$). Le CTA et le diCTA sont très peu abondants ($0,2$ et $0,5 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$).

L’empreinte métabolique des graines ressemble beaucoup à celle mise en évidence dans les racines dans la partie précédente. Les teneurs des 4 composés phénoliques évoluent très largement au cours de la germination de la graine pour tendre vers un profil mixte racines-feuilles. Les teneurs en CQA et diCQA diminuent alors que celles en CTA/5-CQA et diCTA augmentent. La diminution de la teneur en CQA est déjà significative au bout d’une journée d’imbibition, ce qui n’est pas le cas pour les autres composés phénoliques. Deux jours après imbibition, toutes les teneurs sont significativement différentes de celles des graines sèches. On notera que l’augmentation accrue des teneurs en CTA/5-CQA et diCTA et la diminution de celle en diCQA entre le jour 1 et le jour 2, coïncident avec l’émergence des cotylédons (figure 1.5). A ce stade du développement, il est très difficile d’étudier la répartition de ces métabolites dans les feuilles et racines séparés. Nous observons simplement ici un changement métabolique lié à l’apparition des tissus verts. Avant ce stade, les graines ont une empreinte métabolique de type racines et après celui-ci, la plantule tend à acquérir une empreinte de type feuilles.

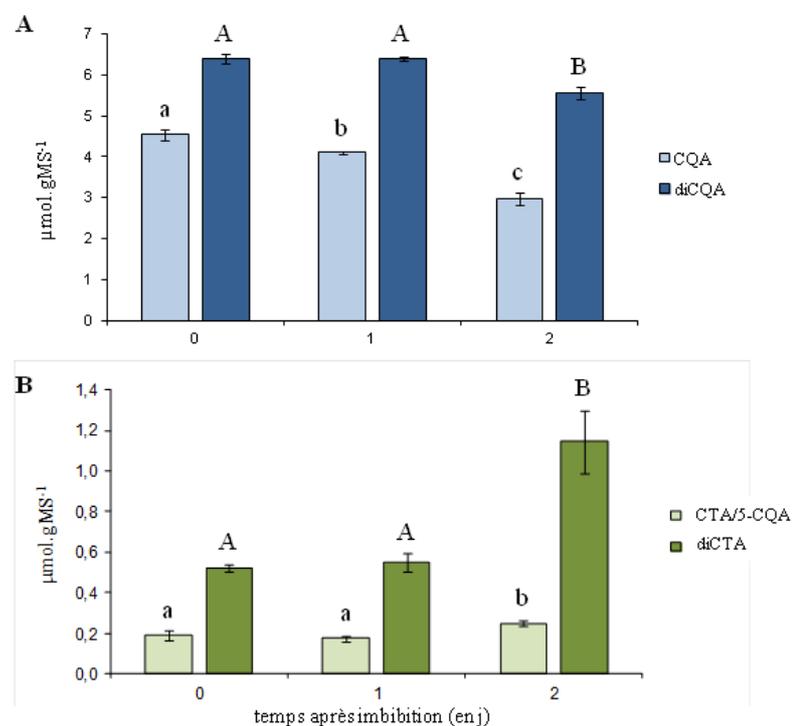


Figure 1.14 : Evolution des teneurs en CQA, diCQA (A), CTA/5-CQA et diCTA (B) au cours des premiers stades de la germination de la chicorée. Pour le temps « 0 jour », les graines sèches ont été utilisées pour les analyses. Pour les temps 1 jour et 2 jours, elles ont été déposées sur papier filtre imbibé de milieu nutritif (MS 0,5X) et placées sous conditions contrôlées en chambre de culture. Des lettres différentes pour un même polyphénol traduisent une différence significative entre les conditions ($P < 0.05$).

Afin d'établir une cartographie plus précise de l'évolution des teneurs en composés phénoliques dans les différentes parties de la plante à des stades jeunes, des prélèvements ont été réalisés sur des plantes un peu plus âgées. A partir d'une semaine, la séparation des parties racinaires et aériennes est réalisable plus facilement. Des plantes âgées de 1 à 6 semaines ont été prélevées et les contenus en polyphénols analysés (figure 1.15).

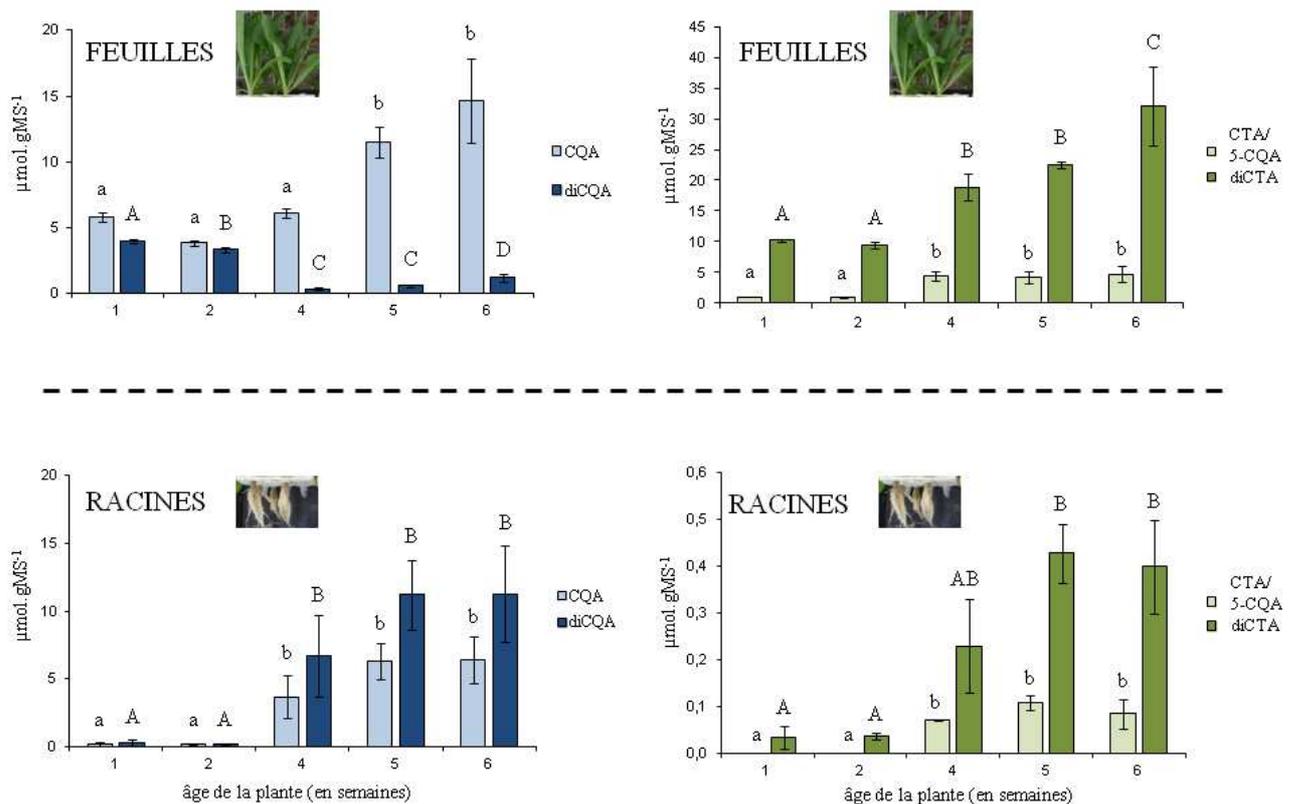


Figure 1.15 : Evolution des teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA des racines et des feuilles de jeunes plantes de chicorée. Des lettres différentes pour un même polyphénol traduisent une différence significative entre les conditions ($P < 0.05$).

Les teneurs de tous les polyphénols varient significativement dans les racines et dans les feuilles au cours du temps (de 1 à 6 semaines). Les teneurs en CQA, CTA/5-CQA et diCTA augmentent de manière significative dans les feuilles et dans les racines, alors que les teneurs en diCQA augmentent dans les racines et diminuent dans les feuilles. Aux stades 4, 5 et 6 semaines, les teneurs dans les racines restent inchangées en fonction du temps, quelque soit l'acide phénolique considéré. Dans les feuilles, les teneurs en CQA, diCQA et diCTA augmentent tandis que celle en CTA/5-CQA reste relativement stable dans cet intervalle de temps.

Les teneurs en composés phénoliques sont donc très nettement liées à l'âge des plantes et aux types d'organes comme nous l'avons démontré successivement. Nous nous sommes par la suite intéressés à la composition en polyphénols en fonction de l'âge des tissus. En effet, les composés à l'étude sont connus pour leur participation à la défense de la plante contre les pathogènes. L'hypothèse selon laquelle la teneur en composés pourrait être liée à l'âge des feuilles a donc été testée. Comme nous l'avons déjà évoqué, la chicorée a un développement en rosette, ainsi, les feuilles sont imbriquées les unes dans les autres au niveau du collet (figure 1.16).



Figure 1.16 : Schéma descriptif de la préfoliation de la chicorée (insertion imbriquée des feuilles les unes par rapport aux autres) (A) (d'après Rameau *et al.*, 1989) et photographies présentant l'organisation en rosette d'une plante de chicorée (B). échelle = 1,9 cm. Plante âgée de 6 semaines.

Les feuilles les plus externes présentes sur le pivot sont les premières à s'être développées et sont donc les plus âgées (appelées F1 dans les analyses) et les plus internes sont les plus jeunes (appelées F4+). Une feuille imbriquée dans une autre est alors plus jeune que cette dernière. Le signe + signifie, qu'en plus d'une feuille chiffrée 4, se trouve le restant des jeunes tissus présents au centre de la rosette de chicorée. Les analyses ont été effectuées sur des plants de 4 semaines. Evidemment, pour des plantes plus âgées, les rangs foliaires sont plus étendus et s'étalent de F1 à F6+ par exemple (figure 1.17).

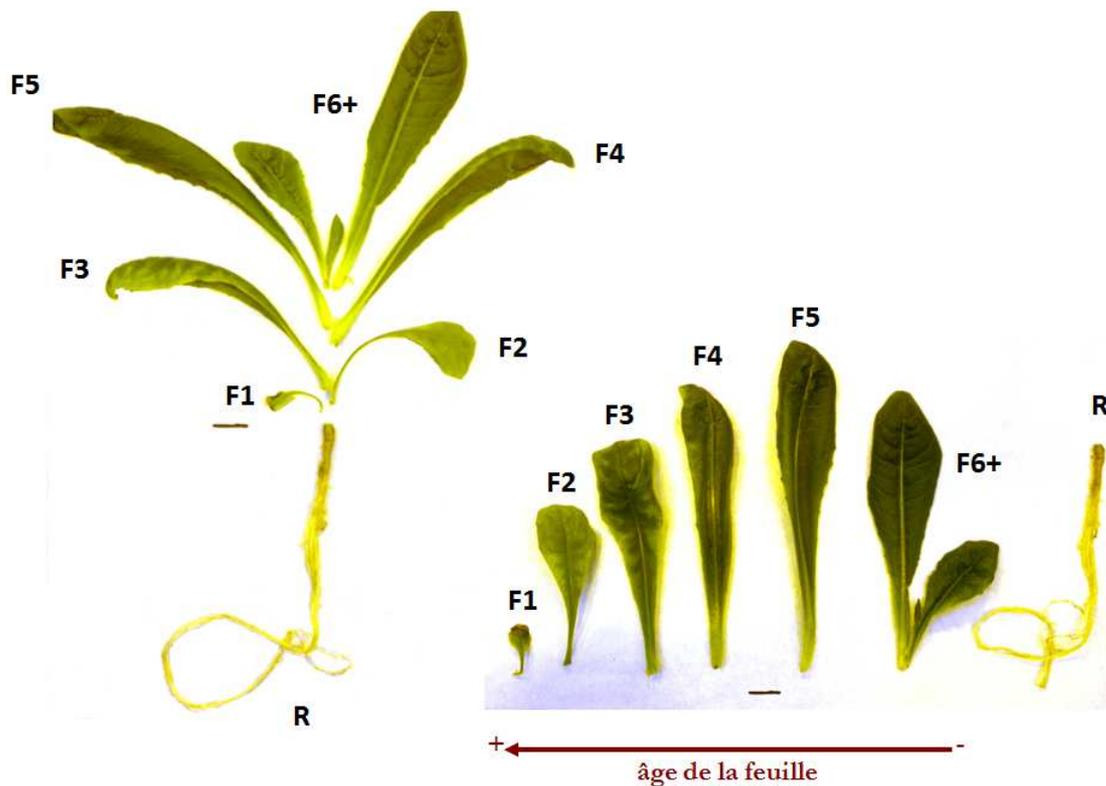


Figure 1.17 : Photographies présentant une dissection d'une plante de chicorée âgée de 6 semaines. Chaque feuille est associée à une dénomination de type F associée à un chiffre correspondant à son rang foliaire. échelle = 1,9 cm.

Les cotylédons ne sont pas présents car déjà désolidarisés de la plante à ce stade.

Chaque feuille est alors prélevée individuellement. Quatre feuilles d'un même rang foliaire et de différentes plantes du même âge sont rassemblées et constituent un échantillon. Ce protocole est renouvelé de manière à obtenir des quadruplicata. Après extraction des polyphénols à partir des échantillons obtenus, ceux-ci sont analysés et quantifiés par HPLC (figure 1.18). Ces mesures permettent de mettre en évidence l'existence d'un gradient de répartition des polyphénols aux différents étages foliaires de la plante. Plus la feuille est jeune, plus la teneur en composés phénoliques est élevée. Cette augmentation est assez progressive d'un étage foliaire vers un autre plus jeune pour les CQA, CTA/5-CQA et diCTA. En ce qui concerne le diCQA, la différence est assez forte et n'est effective que dans les organes très jeunes (x 17 par rapport aux plus vieilles feuilles). Néanmoins, la teneur en diCQA reste relativement faible en comparaison aux trois autres polyphénols et principalement le diCTA.

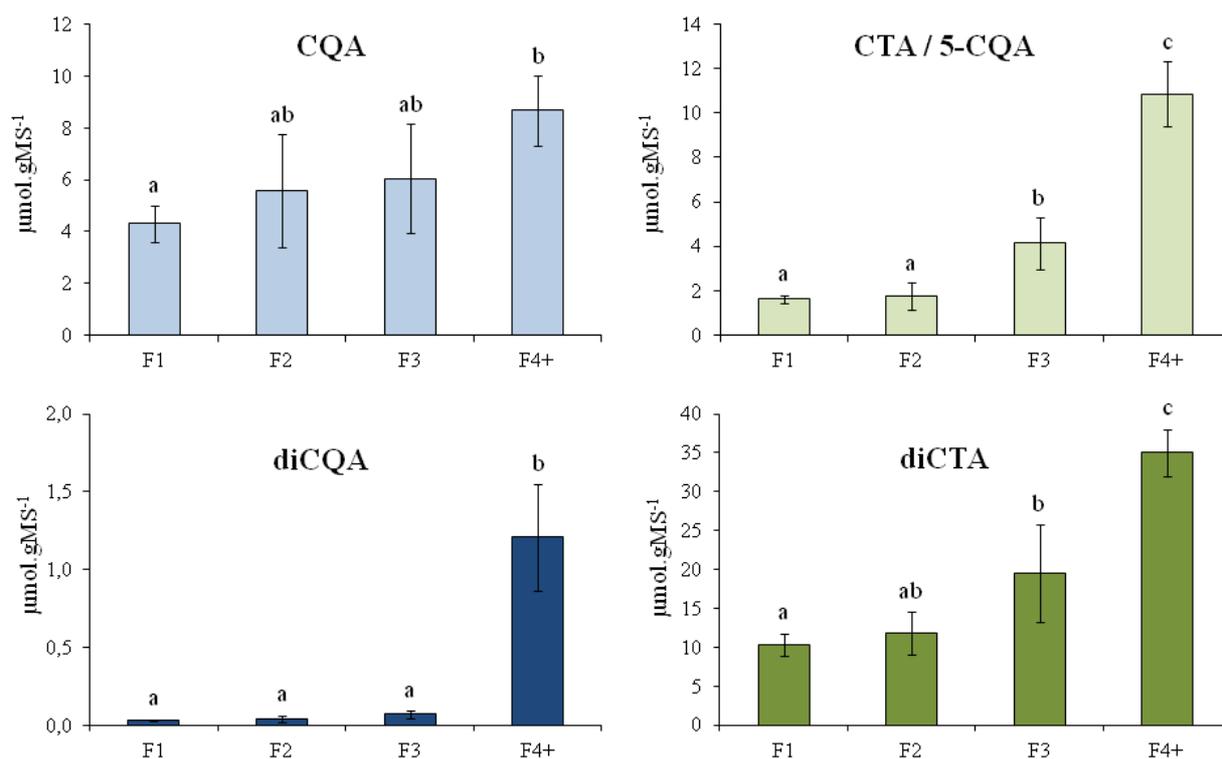


Figure 1.18 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA dans les différents étages foliaires de plantes de chicorée. Les feuilles F1 sont les plus externes au niveau de l'insertion sur le pivot et donc les plus âgées, les feuilles F4+ sont les plus internes et donc les plus jeunes. Des lettres différentes pour un même polyphénol traduisent une différence significative entre les conditions ($P < 0.05$).

Les quantifications ont été effectuées avec une méthode d'analyse HPLC non satisfaisante comme nous l'avons vu précédemment (méthode 2, figure 1.6). Il nous fallait vérifier, dans le cas du CTA, que l'augmentation de la teneur constatée dans les jeunes feuilles par rapport aux feuilles âgées était bien réelle et non le fait d'une augmentation masquée de la teneur en 5-CQA, composé sortant au même temps de rétention avec l'ancienne méthode. L'alignement des chromatogrammes réalisés à l'aide de la méthode 3 confirme que la teneur en 5-CQA est très faible dans les tissus foliaires et qu'elle varie peu (figure 1.19). Les teneurs en CTA décrites précédemment dans le manuscrit semblent bien être le résultat de la quantification de CTA dans les feuilles. Notons au passage, la présence d'un pic identifié par un « ? » dont la teneur est également plus importante dans les jeunes feuilles. Celui-ci présente un spectre d'absorption caractéristique des polyphénols mais n'a pas encore été identifié avec certitude. Ce composé coélué notamment avec du féruloylquinat synthétisé par voie enzymatique à l'aide des gènes clonés présentés dans le chapitre 2. Cependant, une caractérisation structurale plus précise est nécessaire.

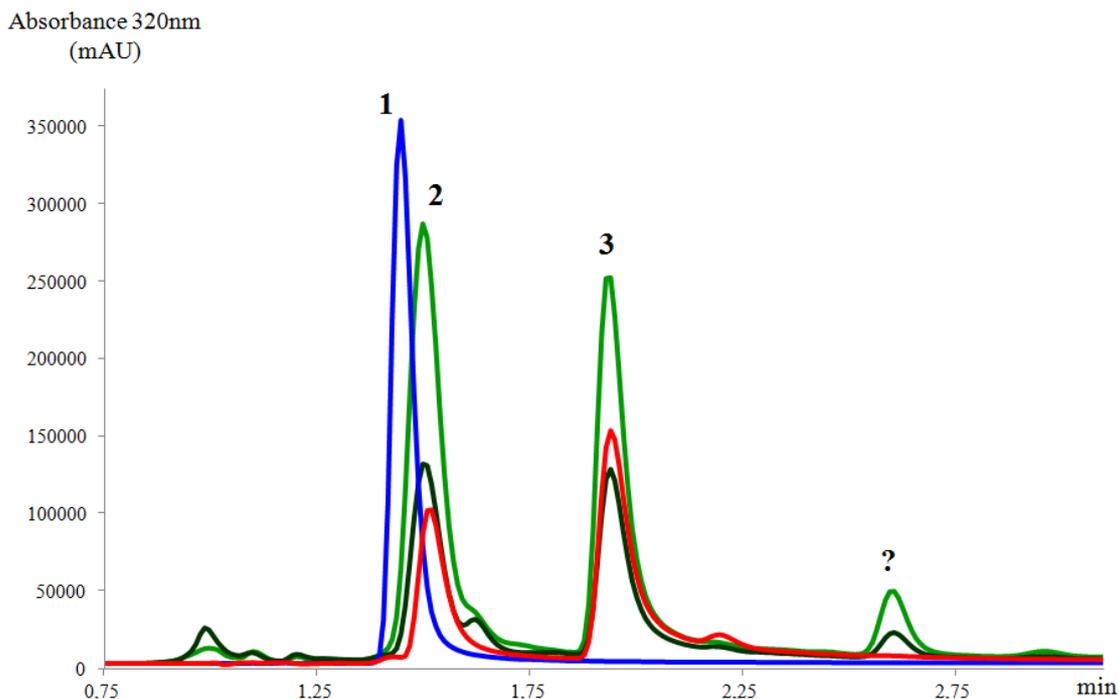


Figure 1.19 : Chromatogramme d'extraits méthanoliques de **jeunes feuilles** (en vert clair), de **feuilles âgées** (en vert foncé) de chicorée, d'une solution commerciale d'**acide néochlorogénique** (5-CQA, en bleu) et d'un mélange de molécules commerciales (CTA et CQA, en rouge). Les produits ont été caractérisés par leur temps de rétention et leurs spectres d'absorption. 1. acide néochlorogénique, 2. acide caftarique, 3. acide chlorogénique.

Ces analyses descriptives font apparaître une distribution originale des 4 composés phénoliques majeurs. La distinction entre les échantillons racinaires et les échantillons aériens est claire. Le CTA et le diCTA sont plus abondants dans les parties aériennes alors que le diCQA est plus abondant dans les racines. Le contenu en composés phénoliques est également très caractéristique de l'âge des plantes et des organes. Notamment, un gradient de répartition des molécules à l'étude dans les différents étages foliaires est mis en évidence.

Au vu de cette organisation métabolique, des questions se posent au sujet du transport de ces composés au sein du végétal ainsi que sur la séparation physique des voies métaboliques, d'un côté responsable de la synthèse de diCQA et de l'autre, celle responsable de diCTA. Pour répondre à ce type de questions, les déterminants moléculaires à l'origine de la régulation de la synthèse et de l'accumulation de ces composés doivent être connus. Un moyen d'atteindre ce but est la comparaison sans *a priori* de l'expression des gènes dans des situations d'accumulation contrastée des composés. C'est ce type de conditions que nous avons recherchées par la suite.

2 Induction de l'accumulation des composés par ajout de précurseurs

En premier lieu, nous avons émis l'hypothèse simple que l'augmentation de la concentration intracellulaire de précurseurs des voies à l'étude pouvait engendrer une augmentation de l'accumulation des molécules cibles. En effet, on peut s'attendre dans ces conditions à une augmentation des flux dans les voies métaboliques recherchées. Dans de telles circonstances, une induction de l'expression des gènes impliqués (agents effecteurs et agents régulateurs) peut être espérée. Nous avons recherché des moyens de moduler l'accumulation des molécules en utilisant des systèmes expérimentaux simples : incubations de disques foliaires et de plantules sur microplaques.

2.1 Sur disques foliaires

Ce système expérimental présente plusieurs avantages. Premièrement, les conditions expérimentales sont facilement contrôlables. De plus, il est possible de mener un grand nombre d'essais et ceci avec peu de matériel végétal de départ. Afin de stimuler la production de CQA, diCQA, CTA et diCTA, plusieurs conditions ont été testées.

2.1.1 Effet de la blessure

Le prélèvement des explants foliaires peut être assimilé à une blessure pour la plante. Les teneurs en composés phénoliques ont été mesurées dans des disques fraîchement coupés et dans des disques incubés 24 h sur le milieu de référence (figure 1.20). La blessure et l'incubation ont un effet visible sur les concentrations des quatre composés phénoliques. Alors que la teneur en diCQA augmente légèrement ($\times 1,3$), celles en CQA, CTA et diCTA diminuent ($\div 2,8$; $\div 1,7$ et $\div 1,5$ respectivement).

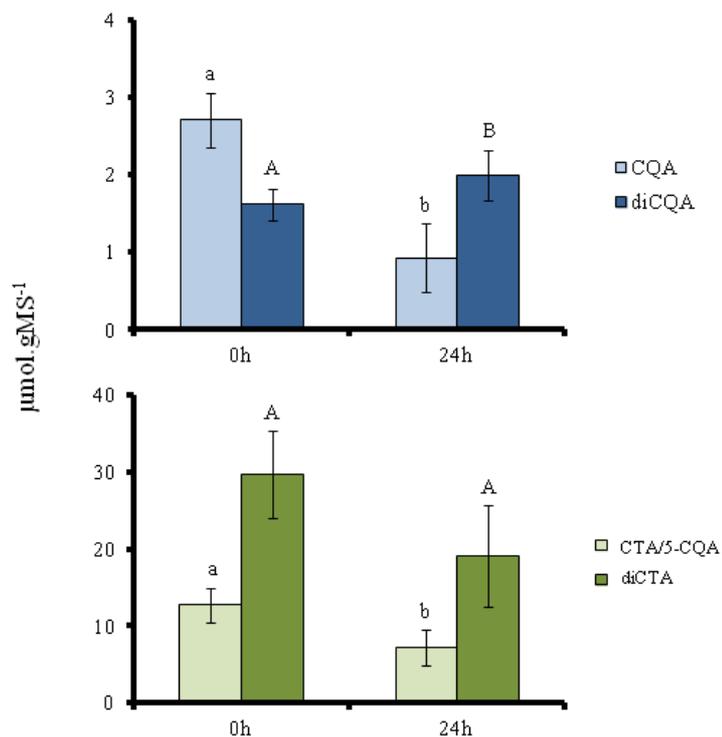


Figure 1.20 : Teneurs en composés phénoliques dans des disques foliaires de chicorée incubés ou non pendant 24 h sur le milieu de culture. Les explants ont été prélevés sur des plantes âgées de 5 semaines.

Des lettres différentes pour un même polyphénol traduisent une différence significative entre les deux conditions ($P < 0.05$)

2.1.2 Ajout de CQA au milieu d'incubation

Le CQA est *a priori* le précurseur du diCQA, il a donc été privilégié pour espérer induire une accumulation plus importante de diCQA dans les feuilles de chicorée. Des disques sont mis à flotter sur le milieu de référence additionné ou non de CQA à la concentration de 1 mM et incubés pendant 24 h. Afin de favoriser la pénétration du CQA dans les tissus, cette incubation est précédée pour un lot de disques d'une infiltration sous vide. Après incubation, les composés phénoliques sont extraits et quantifiés (figure 1.21).

Les disques incubés en présence de CQA contiennent de plus fortes teneurs en CQA et diCQA (x 10 et x 6 respectivement dans le cas des disques infiltrés). Ces augmentations sont effectivement plus fortes lorsque les disques subissent une phase préalable d'infiltration sous vide. Cette technique s'avère être un bon moyen pour augmenter l'efficacité du protocole d'incubation de disques de feuilles de chicorée. Les teneurs quantifiées sont multipliées par 2 voire 3 selon les polyphénols dans le cas de disques infiltrés sous vide (figure 1.21 – B). Il en résulte une concentration plus importante

en diCQA. En ce qui concerne les teneurs en CTA et diCTA, celles-ci sont restées stables malgré l'apport de CQA exogène.

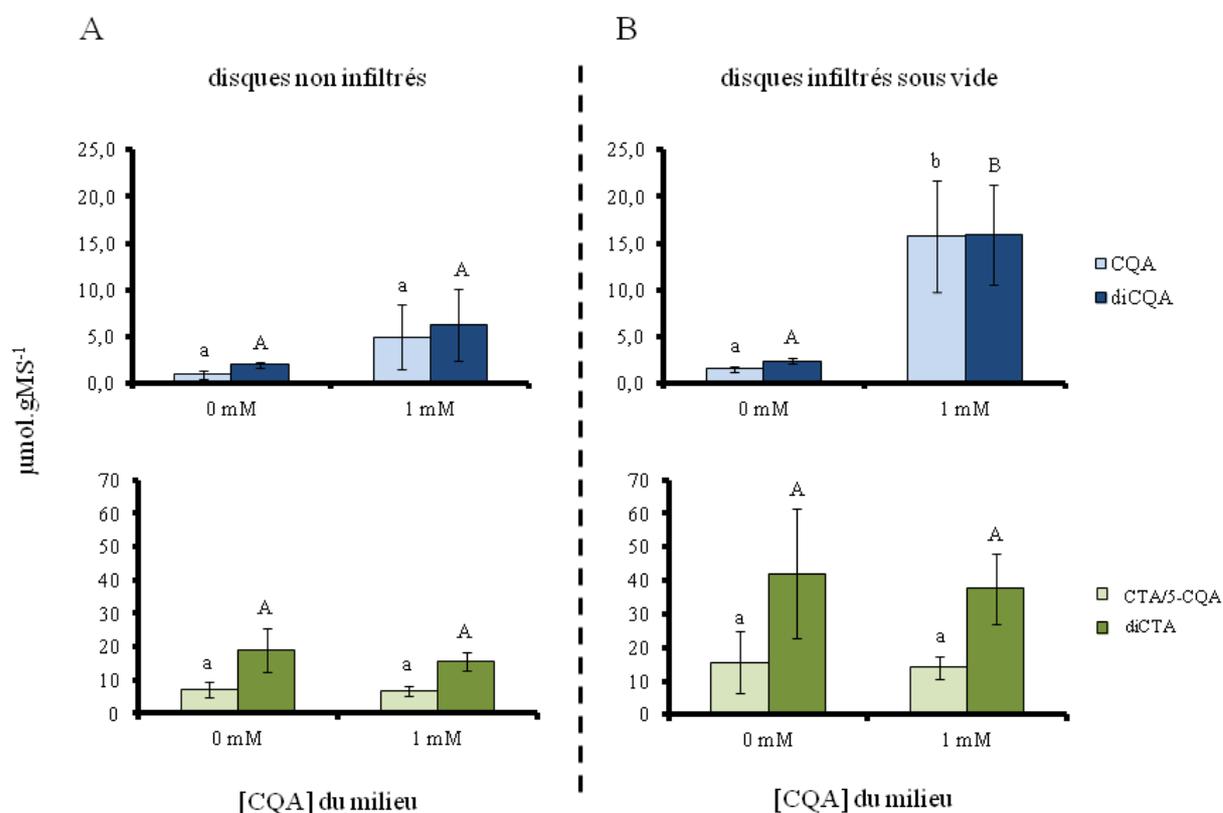


Figure 1.21 : Quantifications des composés phénoliques dans des disques foliaires de chicorée incubés ou non pendant 24 h sur un milieu de culture. Le milieu contient du CQA ou non à la concentration de 1 mM.

A : disques n'ayant pas subi d'infiltration forcée

B : disques ayant subi une infiltration sous vide dans le milieu de culture.

Pour le reste des expériences, les incubations sont réalisées sans infiltration sous vide. Pour aller plus loin, une incubation de disques a été testée pendant 72h et des prélèvements réguliers ont été effectués afin de quantifier les polyphénols d'intérêt et éventuellement d'observer des premiers résultats en terme d'évolution des teneurs (figure 1.22). Le protocole, à savoir l'acte de découpage des feuilles en disques, induit un stress qui se répercute légèrement sur les teneurs en polyphénols. En effet, dans un milieu non enrichi (témoin), on constate de légères augmentations en diCQA et diCTA, assez rapidement au début de l'expérience et une diminution du CQA en fonction du temps. Les légères augmentations en diCTA et diCQA peuvent avoir été provoquées par l'« effet blessure » et la diminution du CQA peut être la conséquence d'une remobilisation causée par le stress. Pour le diCTA, une diminution de la teneur après 24 h d'incubation avait plutôt été observée (voir § 2.1.1 – p 137).

L'apport de CQA au milieu d'incubation provoque des perturbations quantitatives des compositions polyphénoliques. Lorsqu'on observe le matériel incubé dans un milieu sans ajout de précurseurs, les changements en quantité ne sont pas aussi spectaculaires. Ainsi, après 48 h d'incubation, la teneur en CQA a été multipliée par 2,6 par rapport aux disques non incubés, celle en diCQA par 5,8 et celle en diCTA par 1,9. La teneur en CTA/5-CQA est quant à elle stable

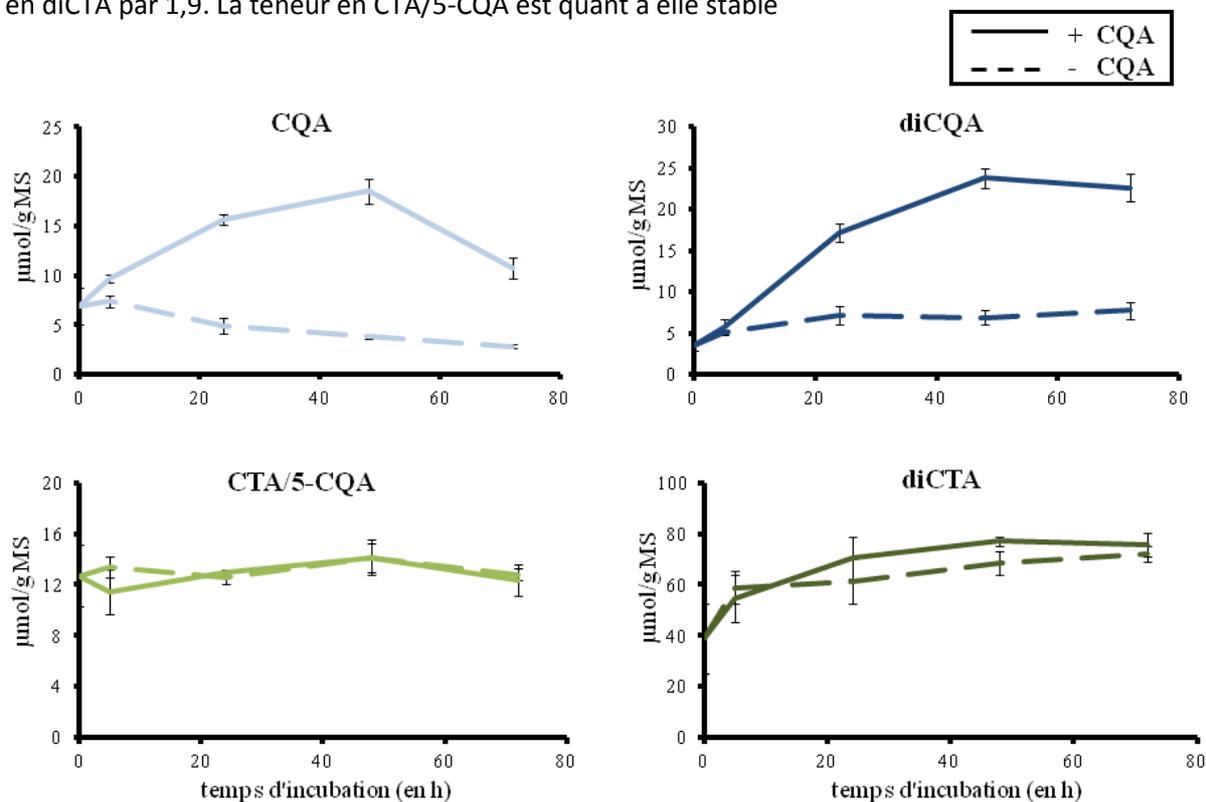


Figure 1.22 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA des disques foliaires de chicorée en fonction du temps d'incubation.

Incubation de disques dans des milieux additionnés (trait continu) ou non (trait discontinu) d'acide chlorogénique à la concentration de 1 mM.

Dans le cas des disques présents sur un milieu enrichi en CQA, les profils similaires des teneurs en CQA et diCQA en fonction du temps d'incubation corroborent le choix d'une hypothèse stipulant un lien biosynthétique existant entre CQA et diCQA. Enfin, il est intéressant de noter que lorsque le temps d'incubation est prolongé au-delà de 48h, la quantité en CQA chute. Cette diminution après 48h peut avoir deux origines possibles : les composés peuvent être convertis ou dégradés car présents en excès ou à cause d'un épuisement métabolique au sein des disques. Une autre possibilité consisterait à imaginer une fuite vers le milieu afin d'équilibrer les concentrations. La concentration interne en CQA des disques après 48 h d'incubation dans un milieu enrichi à 1 mM de CQA est proche de 2,2 mM et chute à environ 1,2 mM à 72 h (figure 1.23).

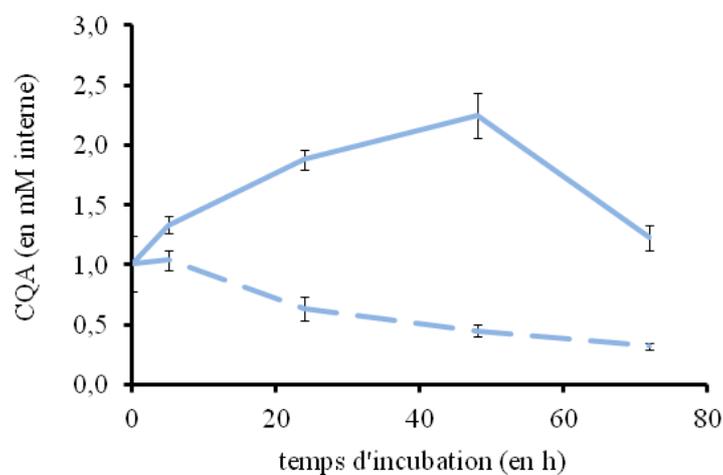


Figure 1.23 : Concentration interne en CQA de disques foliaires de chicorée en fonction du temps d'incubation.

Incubation de disques dans des milieux additionnés (trait continu) ou non (trait discontinu) d'acide chlorogénique à hauteur d'une concentration de 1 mM.

Des incubations de disques dans des milieux différemment concentrés en CQA ont également été entreprises (0, 0,5mM ou 1mM). Les résultats ont été exprimés en concentrations internes afin de mettre en relation les quantifications des CQA et diCQA avec la concentration du milieu d'incubation (figure 1.24). Au vu de l'aspect de la courbe, il y a bien incorporation du CQA au sein des disques. Comme nous l'avons vu, une incubation seule provoque une diminution de la teneur en CQA. Or, lorsque l'on ajoute du CQA au milieu d'incubation, celle-ci se met à croître. Le graphique nous montre que la concentration en CQA contenu dans les disques est presque fonction de la concentration en CQA du milieu. Ensuite, lorsque l'on met en relation la concentration interne en diCQA et celle en CQA des disques, on voit que plus la concentration interne en CQA est élevée, plus la concentration en diCQA augmente de la même façon. La relation semble presque être équimolaire. Lorsque la concentration interne en CQA des disques est de 1 mM, celle de diCQA est approximativement à 1 mM également. En ce qui concerne les teneurs internes en CTA/5-CQA et diCTA en fonction de celle en CQA, aucune évolution n'est constatée. Les variations des conditions d'incubation ne modifient pas leurs teneurs.

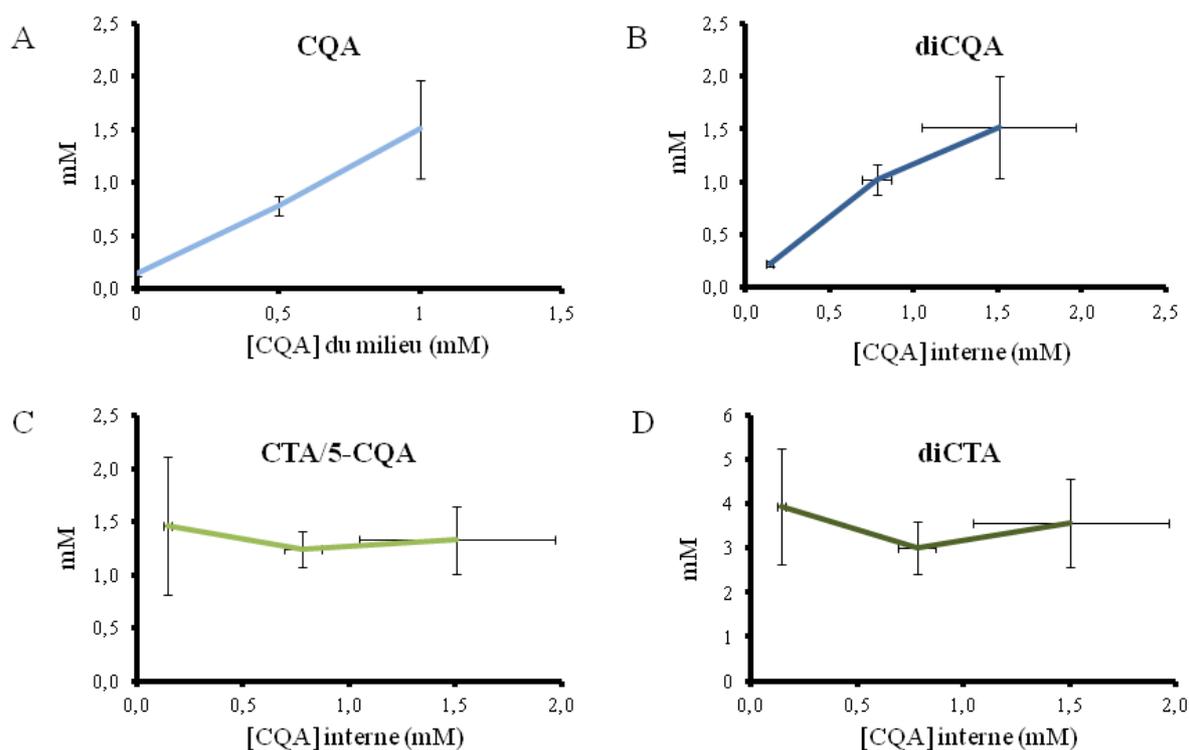


Figure 1.24 : Incubation pendant 24 h de disques foliaires dans un milieu supplémenté de CQA à diverses concentrations (0 ; 0.5 et 1 mM).

- (A) Concentration interne en CQA des disques (en mM) en fonction de la concentration en CQA du milieu d'incubation (en mM)
 (B), (C) et (D) Concentrations internes respectivement en diCQA, CTA/5-CQA et diCTA des disques (en mM) en fonction de la concentration interne en CQA des disques foliaires (en mM)

2.1.3 Ajout d'acide tartrique au milieu d'incubation

Le mécanisme de synthèse du diCTA est transposable à celui du diCQA, dans le sens où le CTA en serait le précurseur. En effet, le diCTA résulterait de la condensation d'un CTA et d'un caféoyl-CoA, la réaction étant catalysée par l'hydroxycinnamoyl-CoA : caféoyl-*meso*-tartrate hydroxycinnamoyltransférase (CCT). Le CTA provient de l'association d'un caféoyl-CoA avec un acide tartrique sous l'action de l'hydroxycinnamoyl-CoA : *meso*-tartrate hydroxycinnamoyltransférase (CTT). Ces deux étapes biosynthétiques ont été mises en évidence chez la prêle (Hohlfeld *et al.*, 1996). Des incubations de disques foliaires ont été réalisées dans des milieux plus ou moins enrichis en acide tartrique dans le but d'induire une augmentation des teneurs en CTA et diCTA. Malheureusement, ces incubations ne mettent en évidence aucune variation nette des teneurs en polyphénols d'intérêt (figure 1.25).

Le fait de ne constater aucune modification des teneurs peut être potentiellement expliqué par un manque de co-substrat (caféoyl-CoA) ou par une inhibition synthétique due à une concentration physiologique maximale déjà présente dans les feuilles. Cependant, aucune donnée ne prouve l'entrée effective d'acide tartrique dans les disques. Il aurait pu être intéressant de réaliser ces incubations avec des milieux enrichis à la fois en CQA et en tartrate. On pourrait imaginer que le CQA permette de fournir le groupement caféoyl nécessaire à la formation de CTA.

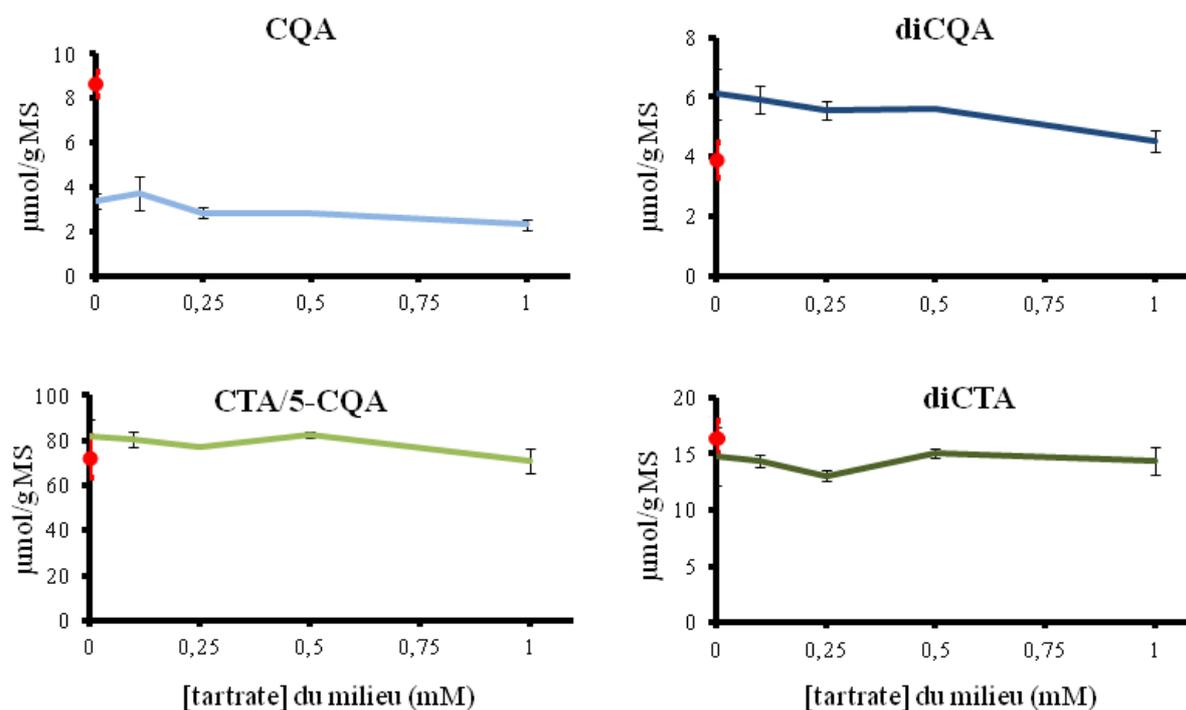


Figure 1.25 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA de disques foliaires de chicorée ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}$) en fonction de la concentration en acide tartrique du milieu d'incubation (mM).

Incubation de 24 h en chambre de culture. Les concentrations en acide tartrique ajoutées dans le milieu sont de 0 ; 0,1 ; 0,25 ; 0,5 et 1 mM.

Le marqueur rouge indique la concentration mesurée du polyphénol correspondant dans des disques non incubés, c'est-à-dire prélevés au moment de la découpe des feuilles et immédiatement fixés dans l'azote liquide pour analyse du contenu en polyphénols.

2.2 Sur plantules de chicorée mises en culture sur microplaques

En parallèle aux tests réalisés sur disques foliaires, des supplémentations en précurseurs de la voie de biosynthèse de ces polyphénols ont également été réalisées dans des milieux d'incubation de plantules entières âgées de 4 jours. En outre, il s'avérait intéressant de tester ce système afin d'explorer ces voies de biosynthèse dans les racines. De plus, la méthode nous paraissait plus

prometteuse car nous émettions l’hypothèse d’un meilleur transport des composés apportés dans le milieu de culture *via* le système racinaire des plantules.

2.2.1 Ajout de CQA au milieu d’incubation

Une supplémentation en CQA a donc été effectuée dans les milieux d’incubation de plantules âgées de quelques jours. Les plantules ont été maintenues pendant 24 h en chambre de culture soit sur un milieu MS 0,5 x simple soit sur ce même milieu enrichi de 1 mM de CQA. La figure 1.26 présente les résultats de la quantification des polyphénols dans les plantules entières après incubation.

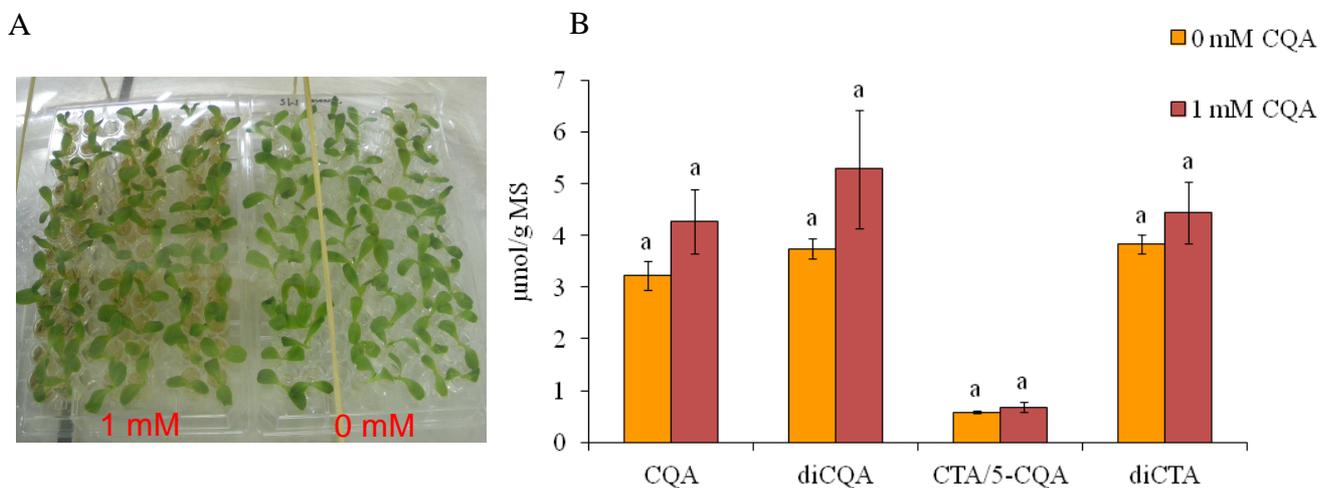


Figure 1.26 : Microplaques avec plantules de chicorée âgées de 9 jours (A) et teneurs en polyphénols des plantules (B),

Incubation pendant 24 h de plantules de chicorée âgées de 9 jours sur microplaques contenant un milieu supplémenté ou non de CQA (1 mM). Les lettres mettent en évidence les différences significatives entre les deux conditions ($P < 0,05$ test de Student)

On remarque que les teneurs en CTA/5-CQA et diCTA restent inchangées, confirmant les propos précédents avec les disques foliaires. En ce qui concerne les deux autres acides phénoliques, une très légère augmentation d’un facteur 1,3 est perceptible. Néanmoins, ces différences ne sont pas significatives ($P > 0,05$; test de Student). Il est probable que le CQA apporté dans le milieu ne soit pas absorbé efficacement dans la plante *via* le système racinaire.

Un brunissement très rapide (après 1 h) du milieu est constaté pour les milieux enrichis en CQA comme cela est visible sur la photographie de la figure 1.26. Ce brunissement peut s’expliquer par

l'action de polyphénol oxydases contenues dans les racines qui dégraderaient l'acide chlorogénique en un produit tel qu'une quinone caractéristique de cette couleur. Le test de brunissement, dont le résultat visuel est exposé en figure 1.27, nous permet d'étayer cette explication. En effet, afin de déterminer si le brunissement était en lien avec la présence du végétal ainsi que du CQA, la même expérience a été réalisée avec ou sans plantule. On repère facilement que le brunissement n'a lieu que lorsque du CQA est ajouté au milieu ; il n'y a pas de brunissement lorsque les plantules sont incubées dans du milieu MS simple. D'autre part, cette modification colorimétrique n'est effective que lorsque les racines des plantules sont en contact avec le milieu. Le brunissement est donc bien le résultat d'interactions entre le CQA et des éléments présents au niveau des racines de chicorée. Cette dégradation du produit testé pourrait expliquer un effet moins net de ces incubations sur plantules par rapport à ceux des disques foliaires.

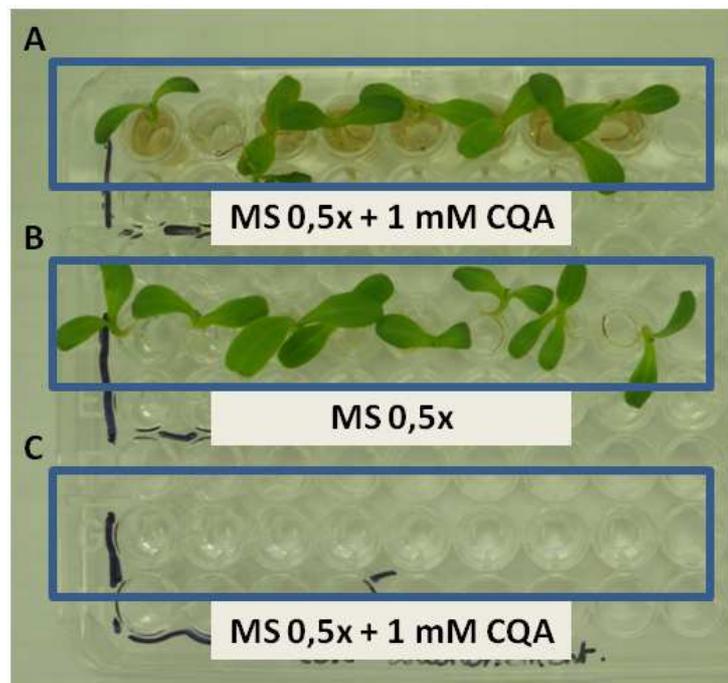


Figure 1.27 : Test de brunissement du milieu d'incubation des plantules sous 3 modalités : plantules dans du milieu MS 0,5x + 1 mM CQA (A), plantules dans du milieu MS 0,5x (B) et milieu MS 0,5x + 1 mM CQA sans plantule (C).

La photographie a été réalisée après 24 h d'incubation.

2.2.2 Ajout d'acide tartrique ou de phénylalanine au milieu d'incubation

L'ajout d'acide tartrique dans le milieu d'incubation a pu aussi être testé avec les plantules. Cela a également été le cas pour la phénylalanine. Pour rappel, cet acide aminé est à l'origine de la synthèse des polyphénols de par sa position initiatrice de la voie des phénylpropanoïdes. Celui-ci nous permettait également de nous affranchir des effets liés au brunissement enzymatique (oxydation des composés phénoliques...).

La figure 1.28 présente les résultats obtenus. On remarque que les évolutions des teneurs en fonction de la concentration en acide tartrique sont similaires pour les acides phénoliques. Une légère diminution est constatée jusqu'à des teneurs de 0,5 mM de tartrate dans le milieu d'incubation. Puis, celle-ci augmente et double dans le cas du CTA/5-CQA et du diCQA, est multipliée par 2,5 pour le CQA et 1,3 pour le diCQA. Une augmentation quantitative pour les deux premiers composés pouvait être attendue. A l'inverse, cela était moins prévisible pour les CQA et diCQA.

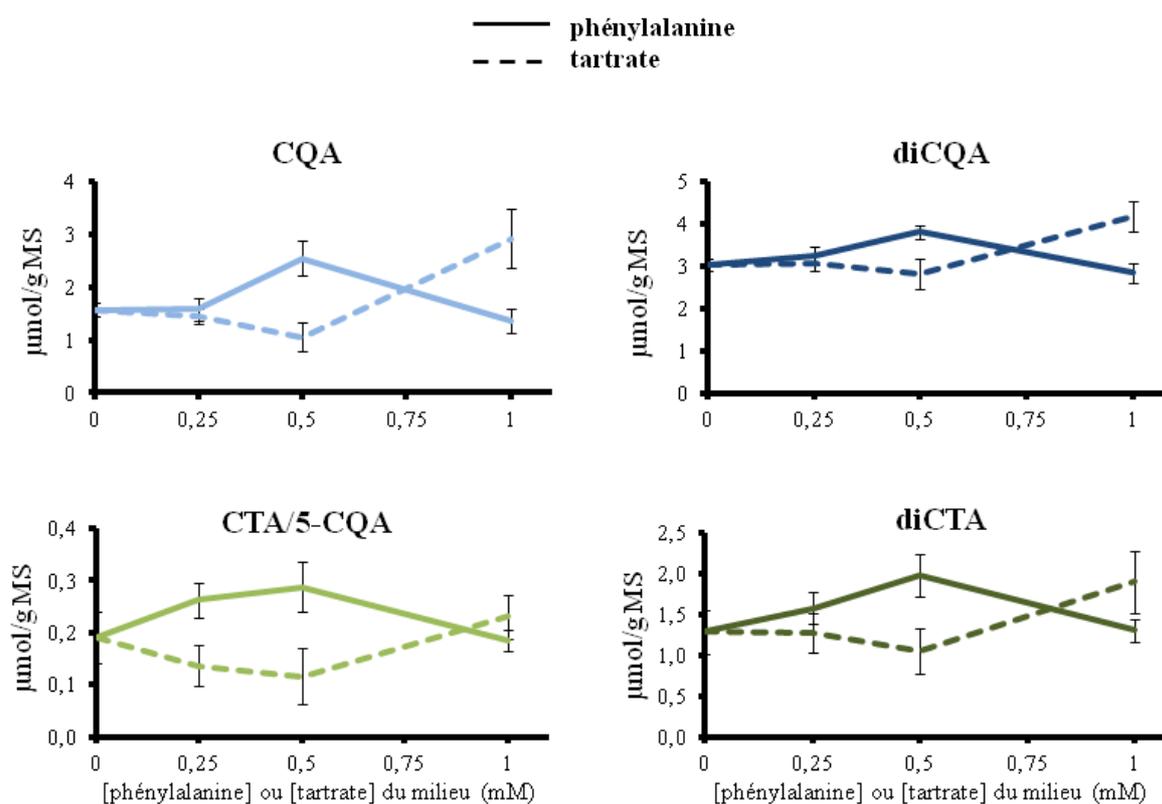


Figure 1.28 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCQA de plantules de chicorée en fonction de la concentration en acide tartrique (trait discontinu) ou phénylalanine (trait continu) du milieu d'incubation.

Incubation de 24h en chambre de culture. Les concentrations en acide tartrique ou de phénylalanine ajoutées dans le milieu sont de 0 ; 0,25 ; 0,5 et 1mM.

Concernant la phénylalanine, il est assez surprenant de voir que les tendances en fonction des concentrations ajoutées au milieu sont à l'opposé de celles décrites par l'ajout d'acide tartrique.

Malgré tout, les variations observées dans l'ensemble par le biais du système « plantules » demeurent relativement faibles, quelque soit le précurseur testé.

Le diCQA est principalement présent dans les racines de chicorée alors que les CTA et diCTA sont présents uniquement dans les feuilles. Les expériences réalisées avec les disques foliaires révèlent que la machinerie biosynthétique du diCQA est bien active dans les feuilles. De plus, un lien biosynthétique entre CQA et diCQA a été mis en évidence, qu'il soit direct, c'est-à-dire métabolique, ou indirect, de régulation. En effet, un plus fort apport en CQA pour les disques entraîne une augmentation de la teneur interne en diCQA. L'augmentation en diCQA pourrait alors résulter de la métabolisation du CQA en diCQA. La teneur en CQA n'a par contre pas d'incidence sur celles en CTA et diCTA. Aucun lien biosynthétique n'a donc lieu d'être établi entre ces composés.

Ainsi, nous pouvons induire la synthèse de diCQA dans les feuilles et potentiellement moduler l'expression des gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse.

3 Induction des voies de biosynthèse par le méthyljasmonate (MeJA)

Certains adjuvants ajoutés au milieu de culture peuvent stimuler la synthèse et/ou l'accumulation de certains produits (Dicosmo et Misawa, 1995). De nos jours, ces élicitations sont courantes dans le cadre de la production de métabolites spécialisés en grande quantité à partir de cultures cellulaires. Les éliciteurs sont des molécules d'origine fongique, bactérienne ou provenant de levures. Des sels de métaux lourds ont été répertoriés comme induisant une surproduction de métabolites spécialisés divers. D'autres molécules, telles que le méthyljasmonate (MeJA) et l'acide salicylique ont également été mis en avant comme composés favorisant l'accumulation de métabolites spécialisés dans les cultures cellulaires (Murthy et Lee, 2014).

Le MeJA induit la voie du jasmonate et a été montré comme éliciteur de la production de métabolites spécialisés, et notamment les composés issus du métabolisme des phénylpropanoïdes. En effet, pour des cultures cellulaires de tabac, une élicitation de 48h au MeJA permet une sur-expression d'un facteur de transcription R2R3 MYB co-exprimés avec des gènes de la voie des phénylpropanoïdes tels que la PAL et la 4Cl. Une sur-expression du gène codant ce facteur de transcription provoque une accumulation de dérivés de la voie des phénylpropanoïdes (Galis *et al.*, 2006).

Au laboratoire, des cultures cellulaires de racines de chicorée ont été établies en parallèle de ce travail. Il a été montré que l'élicitation par le MeJA des cultures cellulaires induisait la production et l'accumulation de CQA et de diCQA. L'effet du MeJA sur des explants foliaires a donc, de même, été évalué. Ce test paraissait intéressant car à la différence des racines, les parties aériennes accumulent les 4 acides phénoliques à l'étude. De plus, nous avons pu voir précédemment que la machinerie biosynthétique de la voie des acides chlorogéniques est active dans le matériel foliaire.

Des disques foliaires préparés comme décrits précédemment sont traités par du MeJA à la concentration de 50 μ M (concentration optimale sur les cultures cellulaires). Des témoins éthanol (solvant du MeJA) ont également été réalisés. A l'issue de l'incubation (de 0 à 72 h), les teneurs des polyphénols sont mesurées (figure 1.29). On remarque qu'après une longue durée d'incubation (72h) les teneurs des 4 polyphénols semblent augmenter légèrement en conditions témoins. Les teneurs en CQA, CTA/5-CQA et diCTA dans les disques traités suivent plus ou moins la même évolution. Cependant, la teneur en diCQA est 10 fois plus forte dans les disques traités par le MeJA que dans les disques traités avec l'éthanol seul. Cette différence significative est bien la preuve que le MeJA a une

action inductrice de l'accumulation du diCQA. Ce qui étonnant est que la teneur en CQA semble peu dépendante de l'application du MeJA, ce qui n'était pas le cas dans les expérimentations réalisées avec les cultures cellulaires.

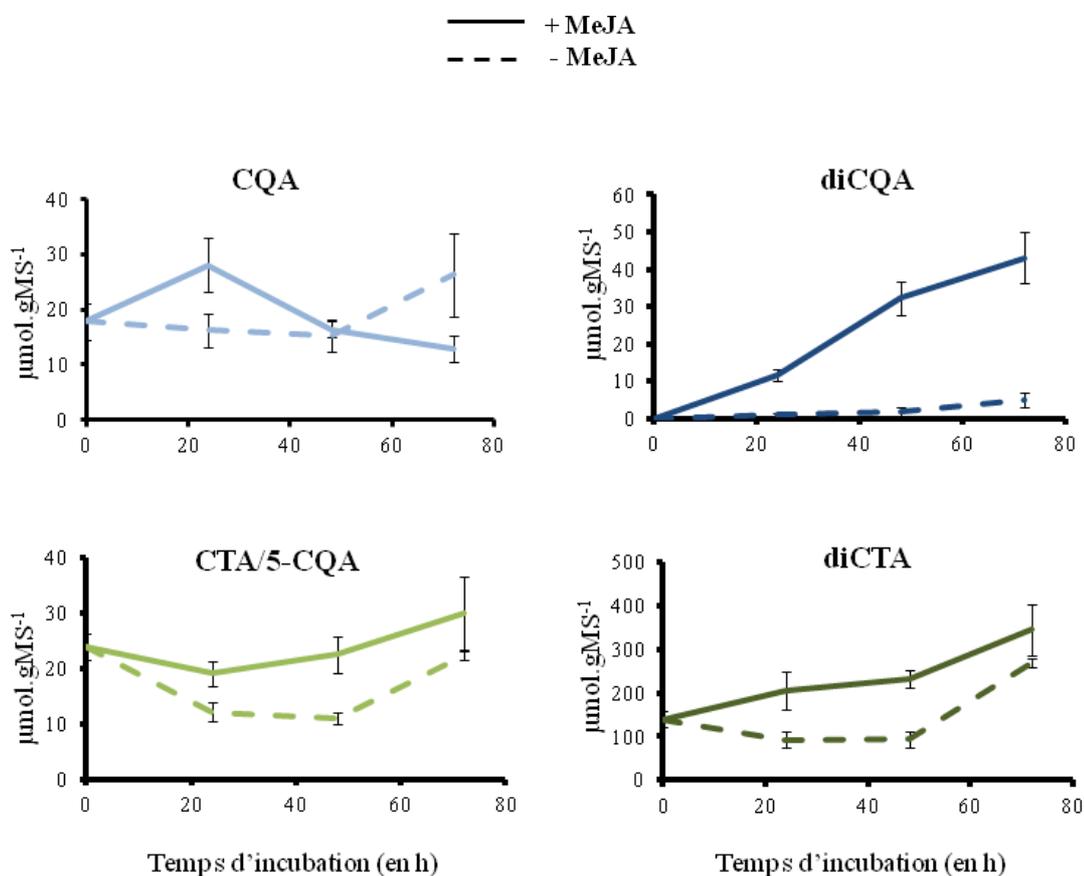


Figure 1.29 : Teneurs en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA des disques foliaires de chicorée en fonction du temps d'incubation. Incubation de disques dans des milieux additionnés (trait continu) ou non (trait discontinu) de MeJA à la concentration de 50 μM . Les milieux sans MeJA ont été complétés en volume équivalent avec de l'éthanol absolu.

Par l'élucation des disques foliaires avec le CQA (voir §2.1.2), les teneurs en CQA interne et diCQA ont été multipliées respectivement par 2,6 et 5,8 en 48h. Dans le cas de l'élucation au MeJA, la teneur en CQA reste constante et celle en diCQA est multipliée par 30 voire plus. Ce protocole d'induction a donc une action forte sur le métabolisme des acides chlorogéniques. Une légère augmentation est perçue pour la teneur en diCTA. Après 48h d'élucation, celle-ci est multipliée par 1,4. Elle était accrue d'un facteur 1,9 dans le cas de l'incubation des disques dans un milieu supplémenté de 1 mM de CQA. Cela reste un effet mineur.

Ainsi, le MeJA stimule l'accumulation de diCQA à la fois dans du matériel racinaire et dans du matériel foliaire.

Les procédés d'élicitation *via* l'utilisation de CQA ou de MeJA, nous permettent en outre d'obtenir des conditions différenciées nettes d'accumulation de diCQA pour étudier l'expression de gènes d'intérêt, et cela à la fois dans les racines et les feuilles. Nous avons effectivement émis l'hypothèse que ces différences d'accumulation pourraient se traduire par des niveaux contrastés d'expression des gènes. Il est intéressant de noter que l'accumulation du CQA n'est modulée dans les tissus foliaires que dans le cas de l'élicitation au CQA. L'élicitation au MeJA des cultures cellulaires de racines, à l'inverse, provoque une accumulation de CQA dans les tissus.

A ce stade, il reste cependant encore des incertitudes sur les processus physiologiques mis en évidence dans cette partie : sommes-nous dans le cas d'une stimulation de la synthèse de diCQA ou est-ce une inhibition de la dégradation de ce composé ?

Néanmoins, même si le diCQA est très peu présent en quantité dans les feuilles, par ces diverses expériences, nous avons réussi à induire son accumulation dans ces tissus. Par ce biais, on démontre également que sa synthèse est bien effective dans les feuilles. En effet, il n'était pas possible auparavant de dire si le diCQA présent dans les feuilles était synthétisé dans les racines puis transporté vers les feuilles ou si un lieu de synthèse était possible dans les feuilles elles-mêmes.

4 Halodépendance de l'accumulation des composés phénoliques

Les molécules étudiées dans ce travail de thèse sont des antioxydants. En appliquant un stress abiotique tel que le stress salin, une augmentation de leur teneur peut être espérée. En effet, la salinité, comme de nombreuses contraintes, induit des stress oxydants. Il nous semblait opportun de tester l'effet du stress sur l'accumulation, entre autres, du CTA et du diCTA pour lesquels nous n'avons pas mis en évidence de forts systèmes d'induction.

D'un point de vue agronomique, le choix de la salinité liée au NaCl paraît pertinent. En effet, la chicorée à torrifier est majoritairement cultivée dans le Dunkerquois, c'est-à-dire sur des sols pouvant comporter des taux élevés en sels. Cette plante est donc d'ores-et-déjà confrontée à la contrainte saline, mais les connaissances sur son comportement en réponse à cela sont parcellaires. Le choix du stress salin s'explique aussi par sa facilité d'application et de suivi au laboratoire.

4.1 Généralités sur le stress salin

4.1.1 La dégradation des sols

La dégradation des sols est un fléau reconnu et commence à être pris en compte, notamment à l'échelle européenne depuis les années 2000. Elle consiste en la diminution de la capacité du sol à fournir des biens et des services écosystémiques et à remplir des fonctions pendant une période déterminée. La dégradation se manifeste sous diverses formes : érosion, salinisation, épuisement des éléments nutritifs, perte de biodiversité, pollution des sols, compactage, perte en matières organiques, imperméabilisation des sols... Selon certaines études, 33% des sols sont en phase de dégradation modérée voire sévère. Le rythme actuel de la dégradation des sols compromet la capacité de répondre aux besoins des générations futures (Food and Agriculture Organization of the United Nations, www.FAO.org consulté le 28 février 2015).

Ainsi, la salinisation des sols constitue une menace environnementale sérieuse pour la survie des cultures. Celle-ci est induite ou exacerbée par les changements climatiques, mais aussi par l'irrigation ou le drainage. Lorsque l'irrigation est trop abondante pour être absorbée par les racines des plantes (absence d'un système efficace de drainage), le sol est humidifié en profondeur, permettant au sel de remonter à la surface. De plus, ce phénomène de salinisation est amplifié par l'évaporation de ces eaux d'irrigation en excès et est à l'origine de la formation de zones d'eau saumâtre. Comme l'irrigation est plutôt intense dans des régions sèches, il se produit une perte d'eau par l'association

de l'évaporation et de la transpiration, phénomène appelé évapotranspiration. Il s'ensuit que les sels qui ont été fournis par l'eau d'irrigation se trouvent concentrés dans le sol.

Le défrichement provoque également des phénomènes de salinisation des sols. Contrairement à la végétation primitive, les cultures laissent le sol nu à certaines périodes de l'année. Les pluies survenant à ces moments ne seront pas absorbées et provoqueront le même problème que pour une mauvaise irrigation : la diffusion du sel vers la surface et la stagnation d'eau. Une autre cause est la remontée des nappes phréatiques salées ou l'irruption d'un biseau salé dans une nappe d'eau douce suite à un pompage dépassant la capacité naturelle de recharge de la nappe. Enfin, dans certaines localités, l'activité minière liée à l'exploitation de mines de sel ou de potasse aggrave également le problème.

4.1.2 Contraintes physiologiques imposées par la salinité

La salinisation se traduit alors par l'accumulation de sels dans les sols. Pour la plante, cela a pour principales conséquences une perturbation de l'homéostasie osmotique, une toxicité due à l'accumulation de certains ions dont l'ion sodium Na^+ , l'ion potassium K^+ ... Cela perturbe également l'assimilation et la translocation d'ions nutritifs (Misra et Dwivedi, 2004) (figure 1.30).



Figure 1.30 : Conséquences d'un stress salin sur la plante.

Une concentration dans le sol de 4 dS.m^{-1} ou 40 mM de NaCl a une pression osmotique proche de $0,2 \text{ MPa}$, ce qui affecte la capacité de la plante à capter l'eau (Munns et Sharp, 1993). Cet effet osmotique provoque par l'intermédiaire de signaux externes une réduction de l'expansion cellulaire des tissus et une diminution de l'ouverture des stomates au niveau des feuilles. Cela affecte donc la conduction du CO_2 *via* les stomates et limite la photosynthèse. Cet effet couplé à la réduction de la surface foliaire engendre un plus faible taux d'assimilats transmis pour les tissus en croissance

(feuilles et racines). Les feuilles sont généralement plus affectées que les racines (Munns et Sharp, 1993). Une augmentation brutale de la salinité du sol provoque une perte en eau des cellules foliaires, mais celle-ci est transitoire (Passioura et Munns, 2000). En quelques heures, les cellules regagnent leur volume originel ainsi que leur turgescence après avoir réalisé des ajustements osmotiques. Malgré cela, l'élongation cellulaire reste diminuée (Passioura et Munns, 2000 ; Fricke et Peters, 2002). Les feuilles se retrouvent alors réduites de par leur taille et leur épaisseur. Les plantes luttent contre les déséquilibres osmotiques en accumulant certains solutés dits solutés compatibles tels que la proline, des polyols, des sucres solubles non structuraux et des bétaines (Sumithra *et al.*, 2006).

La deuxième contrainte majeure imposée par la salinité est la toxicité de l'ion Na^+ et le déséquilibre ionique engendré par sa forte concentration. A cause de la similarité des propriétés physico-chimique entre le Na^+ et le K^+ (rayon ionique, énergie d'hydratation), le Na^+ entre en compétition avec le K^+ dans de nombreux processus métaboliques importants, tels que la synthèse de protéines (Marschner, 1995). Avec plus de 50 enzymes cytoplasmiques activées par le K^+ , la perturbation du métabolisme peut être sévère, à la fois dans les feuilles et les racines. Une compétition peut également avoir lieu avec le Mg^{2+} ou encore le NH_4^+ , principalement au niveau des transporteurs ioniques.

La salinité affecte également la capacité de la plante à acquérir et à métaboliser d'autres nutriments essentiels tels que le calcium, l'azote, le phosphore et le magnésium (Shabala et Cuin, 2008).

Ces effets, à terme, perturbent les fonctions biochimiques et physiologiques de la cellule végétale, la conduisant à une mort cellulaire (Xiong et Zhu, 2002).

Enfin, le stress salin conduit à un stress oxydatif *via* l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à l'origine d'un stress dit secondaire. De fortes concentrations en sels pour les plantes limitent l'assimilation du CO_2 . Ceci se traduit par la stimulation de la formation de ROS tels que l'anion superoxide (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'ion hydroxyle (OH^-) (Peltzer *et al.*, 2002). Leurs effets nocifs se résument à leur capacité à causer la peroxydation des lipides au niveau des membranes cellulaires, des dommages au niveau de l'ADN, la dénaturation de protéines, l'oxydation des carbohydrates et des dérèglements des activités enzymatiques (Scandalios, 1993 ; Noctor et Foyer, 1998 ; Vaidyanathan *et al.*, 2003).

La production de ROS sous conditions salines a lieu à la fois dans les tissus foliaires et les tissus racinaires (Luna *et al.*, 2000 ; Mittler, 2002 ; Mittler *et al.*, 2004). Chez *Arabidopsis thaliana*, des racines exposées à 100 mM de NaCl voient leur génération de radicaux hydroxyles amplifiée d'un facteur 2,5 à 3 (Demidchik *et al.*, 2010).

4.1.3 Les réponses des plantes face au stress salin

La réponse à la salinité s'effectue en deux phases (Munns, 1993 ; Munns *et al.*, 1995). Dans un premier temps, la plante réduit sa croissance à cause des fortes concentrations en sel captées au niveau des racines (effets osmotiques). Dans un deuxième temps, la croissance est réduite résultant des dommages internes causés par le stress. Ce qui caractérise une plante sensible d'une plante tolérante est son incapacité à empêcher efficacement le sel d'atteindre des niveaux toxiques dans les feuilles en transpiration.

On distingue alors deux types principaux de végétaux que l'on classifie selon leur type de réponse face au stress salin : les halophytes et les glycophytes.

Les halophytes

Les halophytes sont des plantes généralement natives des zones salines (environnements proches des estuaires,...). Le terme 'halophyte' signifie que les plantes sont donc originaires des zones salines et requièrent du sel pour pousser correctement : certaines plantes ont besoin de 10-50 mM de NaCl pour atteindre un optimum de croissance et quelques halophytes telles que l'*Atriplex nummularia* croissent mieux avec des concentrations de sels avoisinant les 100 mM de NaCl (figure 1.31).

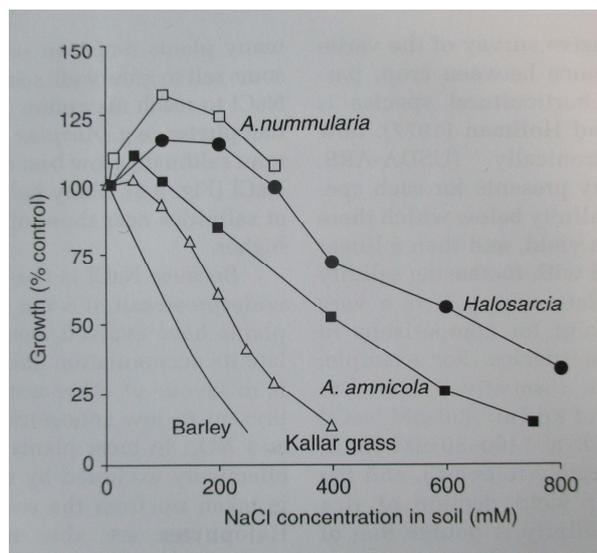


Figure 1.31 : Impact d'un stress salin de différentes intensités sur la croissance de différentes espèces végétales (d'après Shabala et Munns, 2012)

Les espèces végétales présentées sont : *Diplachne fusca* (Kallar grass), *Atriplex amnicola* (swamp saltbusch), *Atriplex nummularia* (old man saltbusch), *Halosarcia pergranulata* (black-seeded samphire), *Hordeum vulgare* (Barley)

Les halophytes les plus tolérantes continuent de pousser sur des sols à des concentrations comprises entre 200 et 500 mM de NaCl. Les halophytes sont capables de maintenir l'exclusion des ions toxiques à de fortes salinités, à l'inverse des glycophytes. Par exemple, *Hordeum marinum* exclut le Na⁺ et le Cl⁻ jusqu'à des concentrations de 450 mM de NaCl (Shabala et Munns, 2012).

Les glycophytes

A l'inverse, les plantes dites glycophytes ne peuvent tolérer que de faibles quantités de sel et peuvent subir des dommages irréparables à des concentrations inférieures à 50 mM (figure 1.31). Le haricot, le soja, le riz sont des espèces glycophytes. Les trois cultures les plus importantes dans le monde sont le blé, le riz et le maïs. Le blé peut pousser sur des sols avec une teneur en NaCl allant jusqu'à 150 mM. Le maïs se positionne entre le blé et le riz, espèce glycophyte, en ce qui concerne sa résistance face au stress salin (Shabala et Munns, 2012). Les rendements en blé commencent à décliner à partir de 60-80 mM en NaCl (Maas et Hoffman, 1977).

Au cours de nos travaux, nous avons voulu évaluer les conséquences d'un stress salin sur le métabolisme des polyphénols. En effet, on pourrait s'attendre à une accumulation plus importante de ces molécules au fort pouvoir anti-oxydant. Le comportement de la chicorée en conditions de stress salin a d'abord été étudié.

4.2 Halodépendance du métabolisme des composés phénoliques au cours de la germination

La germination des graines est l'une des étapes les plus critiques dans la vie d'une plante et est fortement influencée par la salinité du milieu (Misra et Dwivedi, 2004). La salinité du milieu peut complètement inhiber la germination dans le cas de fortes concentrations pour la plante, ou simplement induire un état de dormance dans le cas de concentrations plus faibles (Iqbal *et al.*, 2006).

4.2.1 Effet de la salinité sur la germination des graines

Afin de tester la tolérance de la chicorée au cours de la germination, des graines ont été placées sur du milieu MS 0,5x additionné de NaCl à des concentrations croissantes. Ensuite, les graines germées (pointement de la radicule) sont comptées quotidiennement pour déterminer le

pourcentage de germination (figure 1.32). Les résultats montrent que l'ajout de NaCl affecte significativement le pouvoir germinatif des graines. Cette inhibition est déjà visible pour des concentrations faibles de NaCl (50 mM). L'inhibition est totale lorsque les graines sont mises à germer sur un milieu contenant 400 mM de NaCl et à 300 mM, l'efficacité de la germination est fortement perturbée.

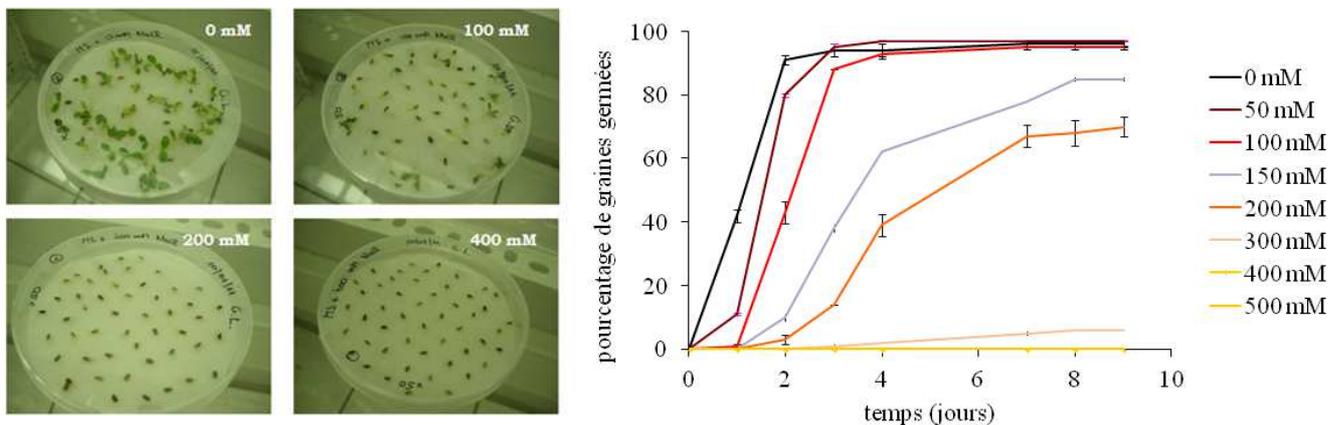


Figure 1.32 : Evolution du pourcentage de germination des graines de chicorée déposées sur des milieux additionnés de NaCl à concentrations croissantes.

Les courbes « 400 mM » et « 500 mM » sont confondues. Photographies réalisées 4 jours après semis dans des boîtes de Petri sur un papier filtre humidifié avec du milieu MS 0,5x additionné de NaCl à la concentration de 0 ; 100 ; 200 ; 400 ou 500 mM de NaCl.

Les paramètres caractéristiques de la germination ont été calculés grâce au programme Germinator (Joosen *et al.*, 2010). Tous les paramètres sont affectés et ceci de manière corrélée à la concentration en sel appliquée (Tableau 1.1). Le temps nécessaire pour atteindre 50% de germination (t_{50}) dans le cas de lots de graines fortement stressées est plus important que pour les graines plus faiblement stressées. Avec une concentration de 50 mM en NaCl, 100 % des graines germent. Ce taux baisse à 73 % avec 200 mM de NaCl. A des fins de comparaison, une expérience identique a été menée sur des graines d'*Arabidopsis thaliana* L. 'Columbia-0'. Pour cette plante, l'inhibition totale de la germination est obtenue avant des concentrations de 300 mM de NaCl alors que pour la chicorée, les graines sont encore capables de germer à des concentrations allant jusqu'à 300 mM de NaCl. Cette moindre tolérance de l'arabette par rapport à la chicorée est confirmée par l'examen des paramètres relatifs à la germination (Tableau 1.1). Les graines d'*A. thaliana* atteignent plus difficilement 100% de germination : dans un milieu contenant 200 mM de NaCl, 73 % de graines de chicorée germent alors que ce pourcentage s'élève à 11 % pour les graines d'*Arabidopsis*. Le temps nécessaire pour atteindre 50% de germination est plus long dans tous les cas chez *Arabidopsis* et ce temps est amplifié plus

rapidement pour des concentrations croissantes en NaCl. Dans le cas de 50 mM de NaCl ajoutés au milieu, le stock de graines de chicorée atteint 50 % de germination avec 50 % de temps supplémentaire par rapport aux graines présentes sur un milieu sain. Pour *Arabidopsis*, dans les mêmes conditions, le stock de graines atteint 50 % de germination avec 94 % de temps en plus par rapport au stock de graines déposées sur un milieu exempt de NaCl.

Tableau 1.1: Paramètres caractéristiques de la germination pour *Cichorium intybus* et *Arabidopsis thaliana*.

Test de germination sur des milieux nutritifs MS contenant différentes concentrations en NaCl réalisé sur une période de 9 jours (soit 216 h).

g_{MAX} : pourcentage maximal de graines germées en % ; t_{50} : temps nécessaire pour atteindre 50% de germination pour chaque modalité en heures.

		[NaCl] du milieu	g_{MAX}	t_{50}
		mM	%	h
<i>Cichorium intybus</i>		0	100	24
		50	100	36
		100	99	49
		150	89	76
		200	73	92
		300	6	151
<i>Arabidopsis thaliana</i>		0	100	34
		50	80	66
		100	87	77
		150	87	102
		200	11	122

Le NaCl entraîne une inhibition de la germination des graines de chicorée et ceci de manière dose-dépendante. Pour savoir si cet effet est lié à la composante ionique ou osmotique du stress salin, des graines ont été placées sur des milieux contenant du NaCl, du KCl, du mannitol et du sorbitol à des concentrations osmotiquement équivalentes (figure 1.33).

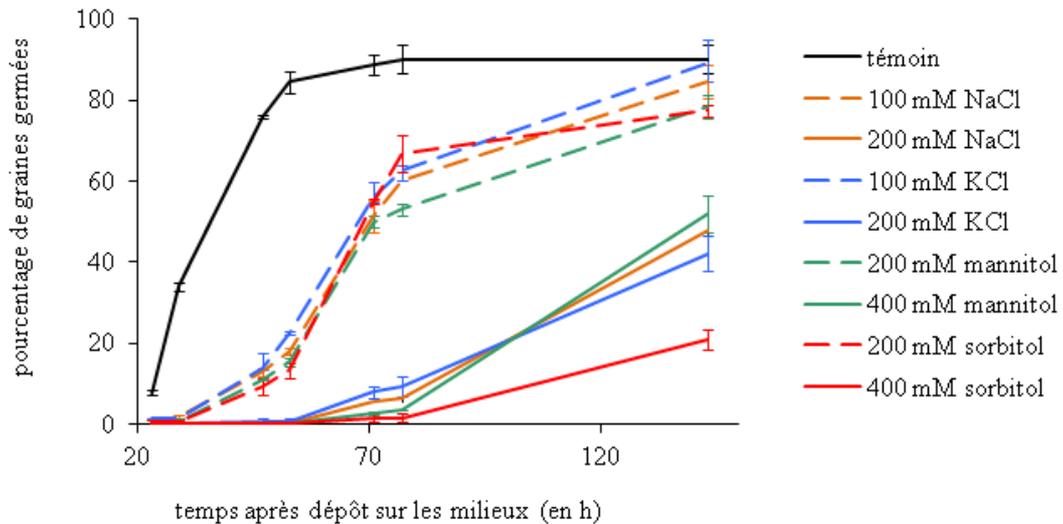


Figure 1.33 : Evolution du pourcentage de germination des graines de chicorée mises à germer en présence de différents *osmotica*.

Test de germination sur milieu MS 0,5x contenant différentes concentrations en NaCl, KCl, mannitol ou sorbitol.

Le stress est perceptible dans toutes les conditions et de façon croissante quand le milieu est plus concentré en produit testé. Tous les *osmotica* ont, à une concentration osmotique équivalente, le même effet sur la germination des graines. L'inhibition de la germination est donc à attribuer à un effet osmotique et non ionique.

L'effet du stress sur la germination est particulièrement sévère à partir de 300 mM. Nous avons cherché à savoir si les dommages causés par le stress étaient réversibles. Pour ceci, après 4 jours de stress avec 300, 400 ou 500 mM de NaCl dans le milieu, les graines sont transférées dans un milieu MS dépourvu de sel (figure 1.34). Les graines ayant subi ce traitement germent de façon beaucoup plus homogène et rapide que les graines n'ayant pas subi le traitement au NaCl. Lorsque le lot témoin se trouve à 50 % de germination, les lots de graines ayant été auparavant stressées, quelque soit la concentration, ont déjà atteint le pourcentage maximal de germination. Ainsi les graines ayant subi un stress atteignent un taux maximal de germination après moins de 24 h de présence sur un milieu dépourvu de sel. Les graines n'ayant pas subi de traitement préalable, quant à elles, atteignent un taux maximal de germination après environ 48 h de germination. Le stress salin n'altère donc pas de manière irréversible la capacité germinative des graines et a même un effet positif.

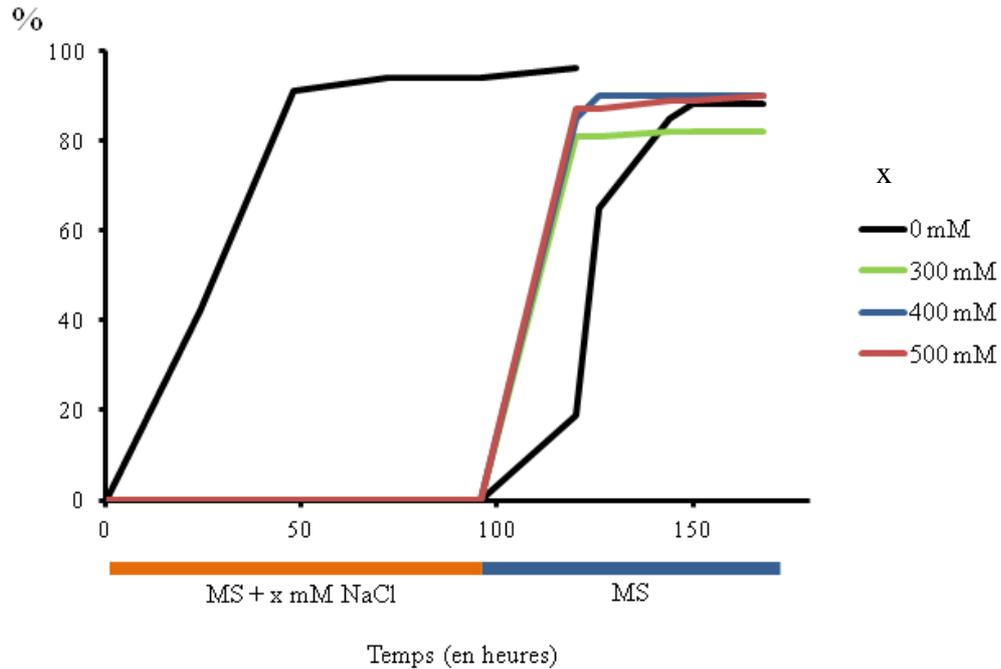


Figure 1.34 : Pourcentage de graines germées en fonction du temps (en heures).

En noir, sont représentés les résultats pour des lots témoins non stressés. Des graines sont mises à germer à t_0 et d'autres après 96 h. Les courbes notées 300, 400 ou 500 mM correspondent aux résultats obtenus avec des graines mises à germer sur du NaCl pendant 96 h (inhibition de la germination) puis transférées sur un milieu dépourvu de NaCl.

Le stress salin a donc un impact physiologique certain sur la germination par son effet osmotique. La comparaison du comportement de la chicorée à *Arabidopsis* semble indiquer qu'elle est dotée d'une tolérance élevée face au stress salin.

4.2.2 Effets de la salinité sur les teneurs en composés phénoliques au cours de la germination

La concentration en NaCl la plus adaptée pour cette étude est 100 mM (inhibition modérée de la germination). Des graines sont mises à germer sur milieu additionné ou non de NaCl (100 mM) et prélevées après 2 ou 4 jours. Les composés phénoliques sont extraits et quantifiés (figure 1.35). Les résultats sont présentés en nmol par individu. L'individu représente une graine, une graine en cours de germination ou une plantule désolidarisée du tégument.

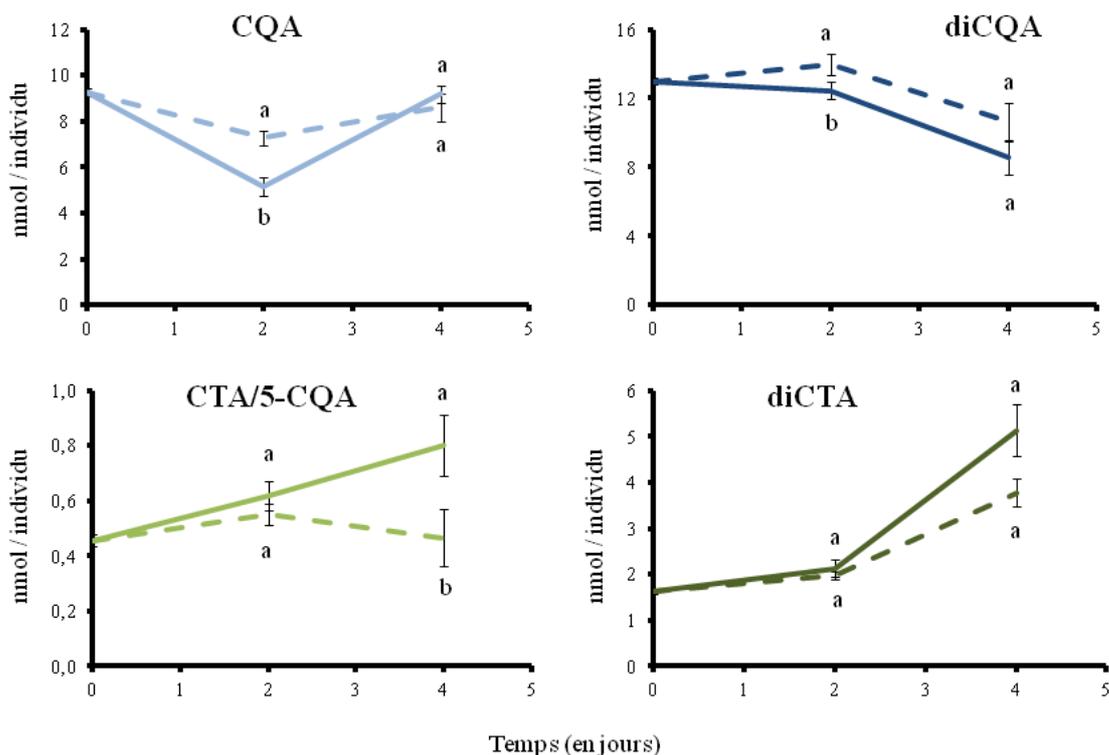


Figure 1.35 : Contenus en CQA, diCQA, CTA/5-CQA et diCTA au cours de la germination de graines en présence ou non de NaCl 100 mM. Un individu représente une graine en cours de germination ou une plantule. Prélèvements à trois temps (0 ; 2 et 4 jours après semis), deux conditions testées : 0 mM de NaCl (trait continu) et 100 mM (trait discontinu). Les lettres mettent en évidence les différences significatives entre les deux conditions (test de Student)

Les CQA et diCQA ont tendance à être produits en plus grandes quantités pour des graines soumises au stress (respectivement x1,5 et x1,2), mais cela ne reste significatif que deux jours après le semis. Par la suite, la différence s'atténue.

En ce qui concerne les CTA/5-CQA et diCTA, les différences s'accroissent après quatre jours alors que les teneurs étaient quasi identiques deux jours après le semis dans les deux conditions. Quatre jours après le semis, en conditions de stress, le CTA/5-CQA est accumulé 1,7 fois plus et 1,3 fois pour le diCTA. Il est intéressant de noter les profils ressemblants pour les deux acides phénoliques. Cela est en accord avec une hypothèse d'existence d'un lien métabolique entre les deux composés : CTA et diCTA. De plus, on remarque de plus fortes teneurs en CTA et diCTA dans les témoins. Cela est probablement dû à un matériel végétal plus vigoureux car non stressé et qui possède une partie aérienne plus importante, lieu d'accumulation privilégié de ces deux esters.

Les investigations sur les graines de chicorée et le processus de germination ont pu nous montrer que cette espèce semble résister à de fortes concentrations en NaCl. Cela a cependant de faibles impacts sur les quantités de composés phénoliques produits.

Dans la prochaine partie de ce chapitre, les effets du stress salin sur des plantes plus âgées, cultivées en hydroponie seront examinées. Cette fois-ci, le matériel nous permettra de faire la distinction entre matériel foliaire et matériel racinaire.

4.3 Halodépendance du métabolisme des composés phénoliques dans les jeunes plants

4.3.1 Définition des conditions expérimentales

Afin de connaître les limites de la tolérance à la salinité de plantes adultes de chicorée, une gamme de stress salin a tout d'abord été testée. Des chicorées âgées de quatre semaines cultivées en hydroponie sont soumises à des chocs salins d'intensité croissante par addition de NaCl (0 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 mM) au milieu MS 0,5x de référence. Ces traitements sont maintenus pendant 14 jours. A 7 jours et 14 jours, des prélèvements ont été effectués en séparant les feuilles des racines et la biomasse mesurée (figure 1.36). L'application de sel à des concentrations de 400 et 500 mM entraîne la mort des plantes. Aucun résultat n'est donc présenté pour ces concentrations en sel. Plus le milieu de culture est riche en NaCl, plus la production de biomasse sèche est affectée. Après 14 jours de traitement avec du 300 mM de NaCl, les plantes ont produit 3 fois moins de biomasse sèche que celles maintenues sous conditions témoins. Cette inhibition de la croissance dose-dépendante est visible sur les racines et sur les parties aériennes (75 % de perte de masse sèche à la fois pour feuilles et racines pour le traitement à 300 mM de NaCl par rapport au témoin). Au contraire, on peut voir qu'avec une concentration de 100 mM en NaCl dans le milieu de culture, la croissance de la plante ne semble pas être affectée.

A 200 mM, les plantes semblent subir un stress modéré. Cette concentration a été choisie pour la suite.

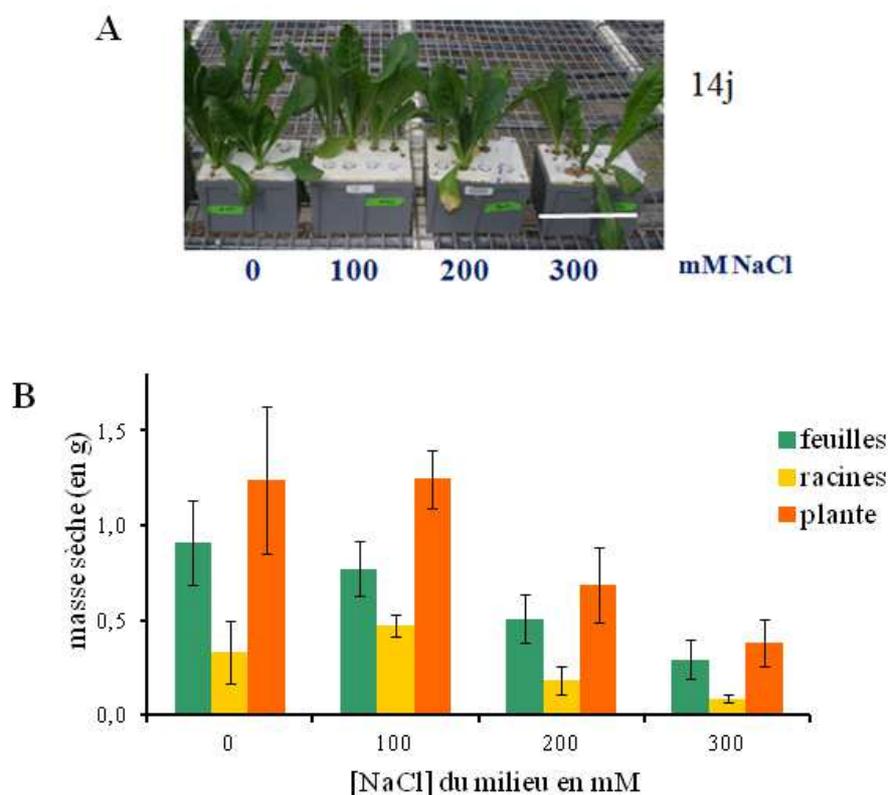


Figure 1.36 : Effet de l'application d'un choc salin d'intensités croissantes pendant 14 jours sur des plantes de chicorée âgées de 6 semaines à l'issue du traitement. A : Photographies des plantes, barre d'échelle = 14 cm. B : Masse sèche des plantes (plante entière, racines ou feuilles).

La proline est un soluté de protection dit osmoprotecteur généralement accumulé à la suite de stress. Elle joue un rôle prépondérant dans la protection des plantes contre le stress osmotique, composante du stress salin (Sumithra *et al.*, 2006). Son accumulation est chez la plupart des espèces de plantes, un marqueur de stress. Afin de s'assurer que les plantes subissaient effectivement un stress dans les conditions retenues, des plantes ont subi un choc salin d'une intensité de 200 mM et des prélèvements ont été réalisés à différents temps (de 0 à 6 jours). En parallèle, des plantes maintenues sur le milieu de référence sont prélevées comme témoins. Le dosage de proline dans les feuilles de ces plantes confirme l'effet du stress salin (figure 1.37). Ainsi, nous pouvons constater que la proline est fortement accumulée dans les feuilles de ces chicorées. Cette accumulation est maximale après l'application d'un stress de 200 mM de NaCl pendant 3 jours ($40 \mu\text{mol.g}^{-1} \text{MS}$). Entre 3 et 6 jours, la teneur en proline reste stable et élevée. Avec l'accumulation de cet indicateur de stress, nous sommes donc certains de l'impact d'un excès de NaCl sur les cultures. Ce stress engendre des effets sur la croissance et le comportement métabolique. Ces conditions ont donc été

retenues afin de s'intéresser à l'effet de cette contrainte sur l'accumulation et la production des composés phénoliques. Cette expérience met en évidence l'aptitude de la chicorée à accumuler ce soluté compatible.

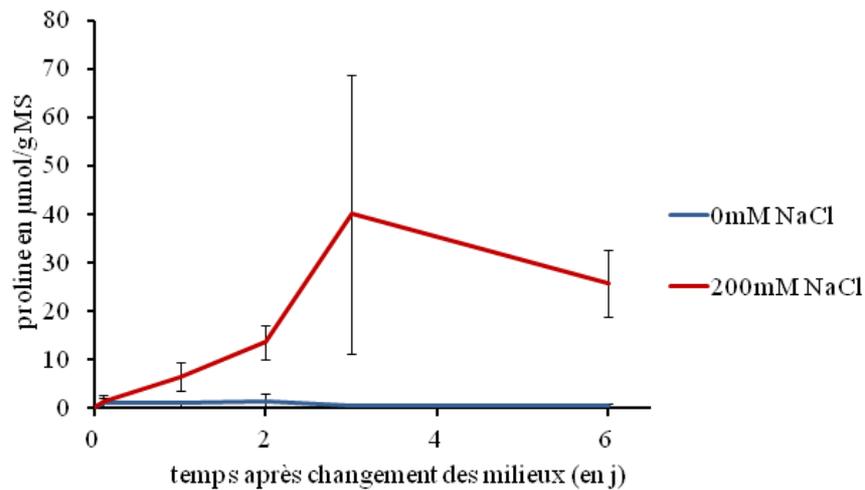


Figure 1.37 : Evolution des teneurs en proline dans les feuilles de plantes de chicorées traitées ou non par du NaCl 200 mM pendant 6 jours.

4.3.2 Effet du stress salin sur les teneurs en composés phénoliques

Les composés phénoliques ont été quantifiés dans les racines et les feuilles des plantes traitées ou non par du NaCl à la concentration de 200 mM (figure 1.38). Il n'y a pas de différence nette entre les deux conditions, hormis dans les racines après 48 h de stress. Les teneurs en CQA et diCQA sont légèrement augmentées. Mais, ces différences sont relativement faibles et ne deviennent plus significatives à 144h ($p > 0.05$). Si ces deux composés jouent un rôle dans la tolérance au stress, alors leur action est transitoire. La plante met en place d'autres systèmes par la suite ou parvient à s'adapter au stress *via* des mécanismes non mis à jour dans cette étude.

Globalement, ces conditions ne semblent pas engendrer de modifications majeures des teneurs relatives en ces quatre acides.

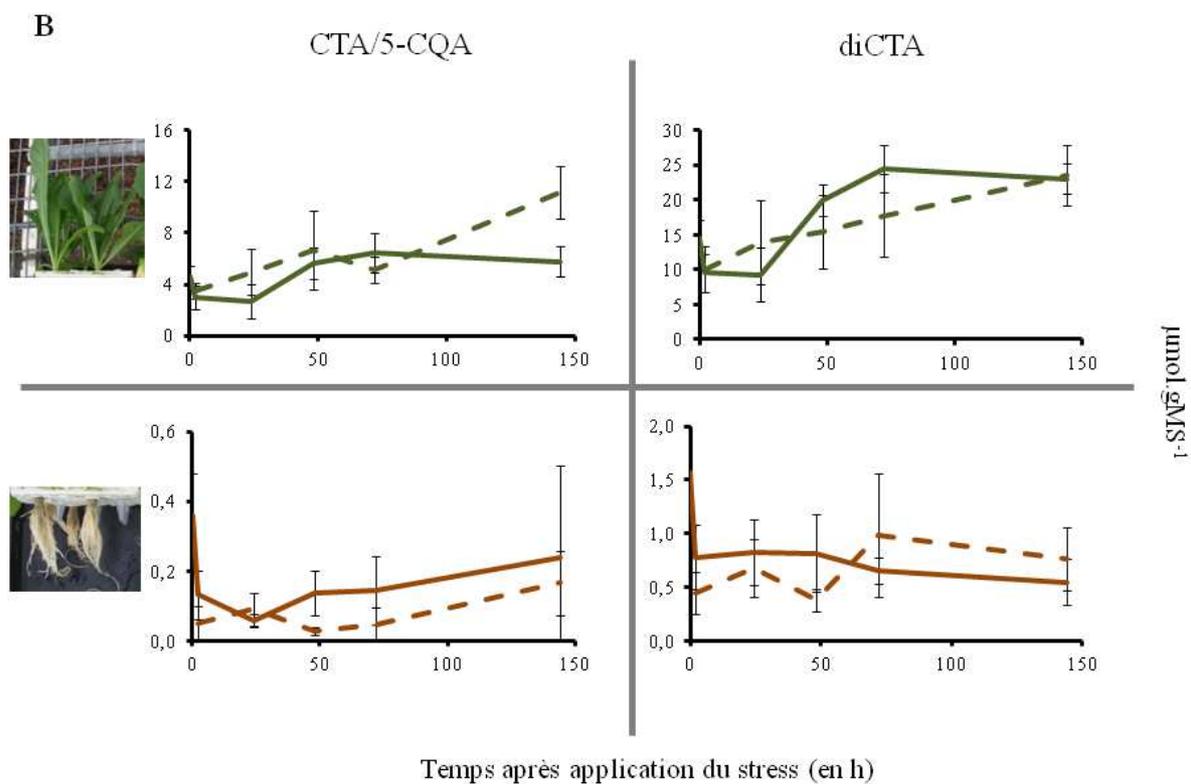
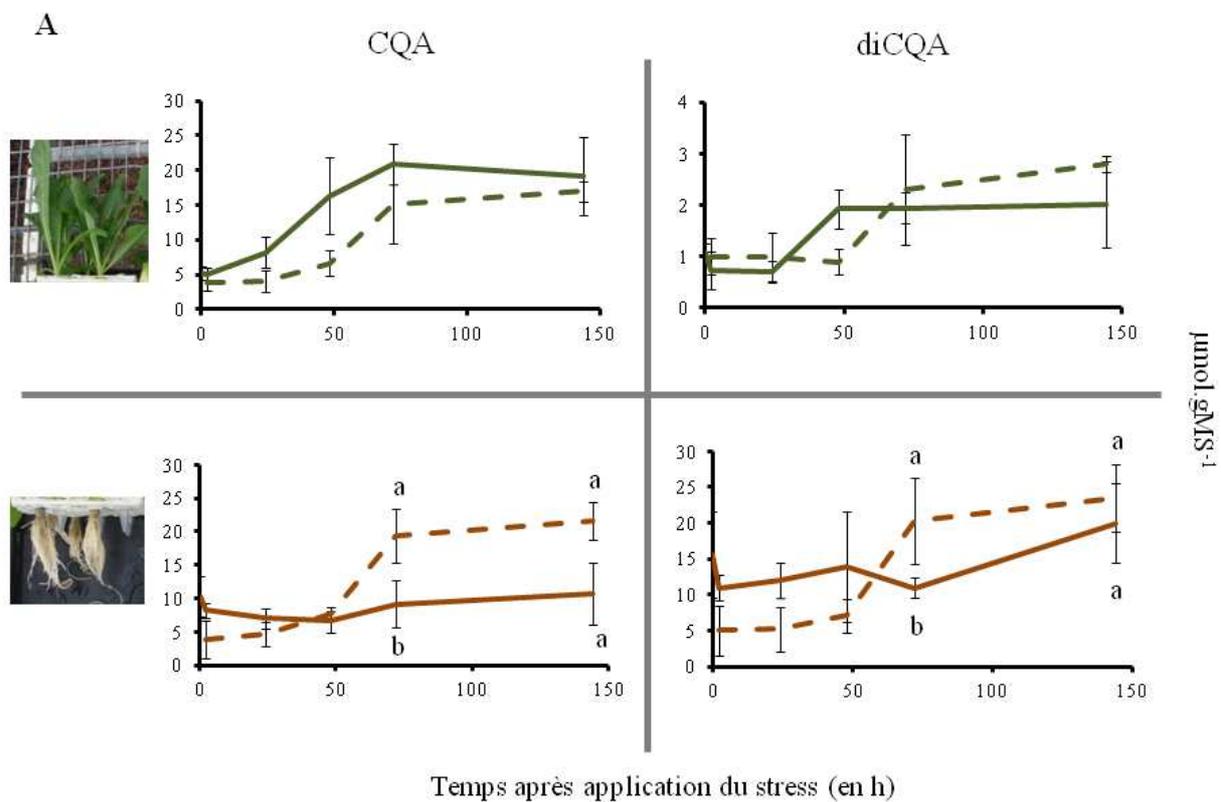


Figure 1.38 : Evolution des teneurs en CQA et diCQA (A) et CTA/5-CQA et diCTA (B) dans les racines et feuilles de chicorées ayant subi (trait discontinu) ou non (trait continu) un stress salin (NaCl 200 mM).

Les lettres mettent en évidence les différences significatives entre les deux conditions (test de Student). Pour les points non précisés, les différences ne sont pas significatives.

Les plantes de chicorée cultivées en hydroponie représentent un matériel intéressant qui nous a permis de débiter des investigations sur la résistance de cette espèce face au stress salin ainsi que de son comportement d'un point de vue du contenu en composés phénoliques dans cette situation. Cependant, l'application de stress salin au cours de la germination ou sur des plantes adultes n'a aucun effet sur les contenus en composés phénoliques, ce qui était l'objectif visé par cette étude. Malgré tout, la chicorée est une plante résistante à de fortes concentrations en sel, son développement est, certes, ralenti voire diminué, mais la plante s'adapte à ces conditions au point que l'on pourrait la qualifier de plante halophyte. En effet, l'inhibition de la croissance est absente même lorsque la chicorée est cultivée dans un milieu contenant 100 mM de NaCl et la plante se développe encore à une concentration de 200 mM. Selon Flowers et Colmer, une plante est halophyte si elle survit et se reproduit dans un environnement avec une concentration de 200 mM de NaCl ou plus (Flowers et Colmer, 2008). Nous n'avons pas étudié le comportement de la chicorée jusqu'à sa capacité à perpétuer l'espèce dans de telles conditions. Cela nécessiterait donc des investigations plus poussées. Ces informations pourraient être utiles dans un contexte de valorisation agronomique de la chicorée. Il serait intéressant d'étudier l'impact de plus fortes teneurs en sel dans le sol sur la tubérisation de la racine ainsi que sur les rendements obtenus. La culture de chicorée pourrait permettre de coloniser des sols plus salés voire peut-être de les décontaminer.

Discussion et perspectives

Les travaux de caractérisation biochimique ont permis de mettre en évidence des différences d'accumulation de composés phénoliques. Chez la chicorée, ceux-ci ont une répartition tissulaire bien caractéristique : CQA, CTA et diCTA sont accumulés dans les feuilles alors que les CQA et diCQA le sont dans les racines. Les graines sont également riches en CQA et diCQA. Assez rapidement au moment de la germination, les 4 polyphénols voient leurs teneurs modifiées : diminution pour les CQA et diCQA et augmentation pour les CTA et diCTA. Une compartimentation s'établit rapidement entre feuilles et racines comme cela a été décrit au début du paragraphe. Le CQA reste quantitativement stable en quantité quelque soit le matériel, graine, feuille ou racine. La légère diminution au cours de la germination semble rapidement contrebalancée par une production accrue. Le CQA joue probablement un rôle métabolique central.

Chez la plante plus âgée, la composition en composés phénoliques de la racine reste stable d'un point de vue quantitatif et qualitatif au cours du développement. Ce qui n'est pas le cas dans les feuilles, en effet, les teneurs en CQA, diCTA et diCQA augmentent avec l'âge. Notons, cependant, que le diCQA reste présent en petite quantité.

Toutefois, nous avons pu voir que dans les parties aériennes, la répartition est complexe et non uniforme. Les CQA, CTA et diCTA sont présents de façon plus concentrée dans les jeunes feuilles et cela est progressif d'un étage foliaire à un autre. En ce qui concerne le diCQA, il est également plus concentré, mais de manière stricte, dans les très jeunes tissus. Dans ce cas, cela ne ressemble en rien à un processus progressif. Deux possibilités peuvent être imaginées : soit il y a une synthèse accrue dans les jeunes tissus de ces composés expliquant ces répartitions dépendantes du tissu, soit il existerait un transport des composés d'organes âgés vers les organes jeunes. Pour apporter des éléments de réflexion, des investigations concernant l'expression des gènes connus impliqués dans la synthèse de ces polyphénols sont des études qui ont un intérêt à être menées. Quelques informations en ce sens seront apportées dans le chapitre 2 de ce manuscrit.

A propos du rôle physiologique de ces composés, nous pouvons tirer des informations importantes de ces expériences. Nos données sont cohérentes avec les hypothèses existantes sur les rôles de ces acides. Le CQA est l'un des polyphénols les plus ubiquitaires chez les végétaux et possède des rôles importants dans les fonctions physiologiques des plantes, notamment de défense (Kojima et Uritani, 1973 ; Maher *et al.*, 1994 ; Niggeweg *et al.*, 2004). Chez la chicorée, les feuilles sont plus riches en composés phénoliques de manière générale, or ce sont les parties de la plante particulièrement exposées à des attaques de pathogènes ou d'herbivores. De plus, cette richesse est une

caractéristique forte des jeunes feuilles ; tissus fragiles mais extrêmement importants pour le développement de la plante de par le gain apporté à la fitness générale du végétal. On peut facilement faire le lien entre les observations et l'hypothèse de Rhoades exposée plus haut dans ce chapitre : « A l'intérieur d'un organisme, les défenses sont localisées de façon proportionnelle au risque du tissu particulier et de la valeur de ce même tissu en terme de gain en fitness et inversement proportionnelle au coût de défense de ce tissu en particulier » (Rhoades, 1979).

Des conditions contrastées d'accumulation ont alors pu être mises en évidence par une caractérisation des contenus en polyphénols chez la chicorée. Il est possible d'induire les voies de synthèse. Les expériences sur les incubations de disques foliaires ont montré, que d'une part le protocole, *via* probablement un stress lié à sa mise en place, influence les contenus des tissus, mais d'autre part, l'ajout de certains précurseurs peut avoir une action positive sur l'induction des voies. C'est le cas, notamment du CQA, qui, lorsqu'il est ajouté au milieu d'incubation entraîne de plus fortes teneurs en CQA et diCQA des disques de feuilles. Deux points importants peuvent être tirés de cela. Tout d'abord, la machinerie biosynthétique du diCQA est active dans les feuilles. D'autre part, le CQA est confirmé comme ayant un rôle dans la synthèse du diCQA. On peut alors suspecter une filiation métabolique entre ces deux composés. Néanmoins, ceci ne permet pas d'exclure un rôle régulateur du CQA sur la synthèse de diCQA plutôt qu'une simple relation substrat-produit. Dans la lignée de ces réflexions, ceci nécessite des expériences complémentaires : fourniture de substrats marqués et suivi de métabolisation par exemple. Une autre approche consiste à mettre en évidence la ou les enzymes hypothétiquement impliquées dans le passage de l'acide chlorogénique vers l'acide isochlorogénique. L'étude de Kojima et Kondo a, en effet, mis en évidence l'existence d'une enzyme qui permettrait le transfert du groupement caféoyl d'un acide chlorogénique vers un autre pour former l'acide isochlorogénique (Kojima et Kondo, 1985). Elle a d'ailleurs été purifiée en 1987 par Villegas et son équipe (Villegas *et al.*, 1987). Cela a constitué une grande part du travail de thèse présenté dans les chapitres 2 et 3.

Le MeJA a également la capacité de provoquer une forte accumulation de diCQA lorsqu'il est apporté au milieu d'incubation de disques foliaires de chicorée, et de façon plus spectaculaire que pour l'ajout de CQA. Il est intéressant de noter qu'il induit aussi une légère accumulation en CTA/5-CQA et diCTA. On peut imaginer que le MeJA a une action inductrice bien en amont dans la voie de biosynthèse des CTA, diCTA et diCQA, dans une partie synthétique commune. Comme décrit précédemment, l'apport en MeJA conduit à une sur-expression d'un gène codant un facteur de transcription, qui lui-même provoque une accumulation de dérivés de la voie des phénylpropanoïdes (Gális *et al.*, 2006). Cependant, il est alors étrange que la teneur en CQA ne soit pas affectée de la

même manière, sauf si le CQA en excès est remobilisé pour la synthèse de divers composés, du fait de sa position centrale supposée dans le métabolisme.

Les résultats de ce chapitre ont permis également de caractériser notre matériel végétal, la chicorée, et d'évaluer sa résistance face au stress salin, information qui n'a été relayée que récemment et de façon partielle dans la littérature scientifique (Ghanaatiyan et Sadeghi, 2015). Les expériences de mesure de capacité germinative en réponse au sel et de croissance en situation de chocs salins chez des plantes adultes permettent de classer la chicorée parmi les plantes tolérantes à l'ajout de NaCl. Elle supporte des teneurs allant jusqu'à 300 mM de NaCl dans le milieu de germination et de culture, l'eau de mer étant concentrée à environ 533 mM de NaCl. Le *Crithmum maritimum*, qualifiée d'halophyte, est une plante maritime pouvant se développer jusqu'à des concentrations de 500 mM de NaCl dans le milieu (Hamed *et al.*, 2004). Le processus germinatif des graines de chicorée s'avère simplement ralenti lorsque la concentration en NaCl augmente dans le milieu. Le NaCl a pour conséquence d'inhiber la germination par un effet osmotique. La réversibilité de cette inhibition, marquée par une reprise de germination en conditions favorables, montre que le métabolisme après une telle contrainte n'est pas endommagé. Cette technique de traitement pré-semis est utilisée en production végétale et porte le nom d'halopriming. Cela consiste à hydrater partiellement la semence de façon à amorcer les processus germinatifs. Dans le cas de l'halopriming, des solutions à forte force ionique sont utilisées (NaCl, CaCl₂, CaSO₄, KCl, KNO₃ à des concentrations allant de 50 à 200 mM et des temps d'exposition de 12 à 24h). L'imbibition des semences avec des quantités restrictives en eau (stress osmotique) permet une hydratation suffisante et avance les processus métaboliques tout en retenant la germination et la perte de tolérance à la dessiccation. Les semences pré-traitées sont de nouveau séchées et stockées. Une fois re-imbibées, elles germent plus rapidement, ont une meilleure vigueur et apportent des rendements plus élevés (Ashraf et Foolad, 2005 ; Shabala et Munns, 2012). De plus, la germination des semences est alors synchrone.

L'impact de fortes teneurs en sels sur le développement global de la plante reste indéniable, mais celle-ci s'accommode relativement bien. Ce constat est assez cohérent quant aux informations connues des origines de la chicorée. En effet, elle est originaire de zones semi-arides (Méditerranée pour *C. intybus* et Himalaya pour *C. endivia*) et a probablement acquis une bonne tolérance face au stress salin (Shannon et Grieve, 1998). Forts de ces informations, nous pouvons penser que la chicorée a un avenir prometteur en tant que plante fourragère. D'autant plus, que les mécanismes impliqués dans la résistance au stress salin sont communs à ceux mis en jeu dans la résistance à la sécheresse car ils relèvent tous les deux d'un stress osmotique. La productivité d'un végétal dans des conditions salines autant que sur un sol sec dépend de sa capacité à maintenir une croissance de

feuilles jeunes (Shabala et Munns, 2012). La chicorée a vraisemblablement cette capacité, et on peut légitimement se poser la question de l'importance de sa composition en composés phénoliques pour cette caractéristique d'adaptation physiologique.

L'implication des composés phénoliques dans les mécanismes de protection du végétal face à des attaques pathogènes est de plus en plus reconnue. Par l'application d'une contrainte saline, nous pensions pouvoir moduler la synthèse des composés phénoliques de façon positive. Cependant, l'application d'un tel stress est faiblement inductrice de l'accumulation des composés d'intérêt chez la chicorée. Sa bonne adaptation au stress a peut-être masqué d'éventuels bouleversements métaboliques.

Pour la suite des travaux, la thèse portant principalement sur la synthèse du diCQA, ces résultats apportent des outils à exploiter. Nous pouvons induire une plus forte teneur en diCQA dans les feuilles, *via* une incubation de disques foliaires (élicitation au CQA ou MeJA), ou dans les racines, par des cultures cellulaires (élicitation au MeJA).

Une approche de génétique inverse et de transcriptomique s'avère intéressante afin d'identifier les gènes impliqués dans la synthèse et la régulation du diCQA. L'hypothèse simple de départ étant que la modification des statuts métaboliques devrait être associée à des modifications des profils transcriptionnels des gènes impliqués.

La technique du RNA-séq permet une quantification sans *a priori* de l'expression du transcriptome. Les conditions contrastées mises en évidence dans ce chapitre constitueront un matériel différentiel dans l'expression des gènes impliqués dans la synthèse du diCQA (gènes effecteurs et régulateurs). Des gènes mis en évidence directement par la comparaison de transcriptome ou simplement par des identifications dans des banques génomiques en référence à des enzymes dotées d'activité comparable (voir chapitre 2) constitueront des candidats. La validation de ces gènes candidats potentiellement impliqués dans la synthèse de diCQA pourra être réalisée par qRT-PCR. Dans cette optique, des gènes de référence ont été validés au laboratoire. Les cultures cellulaires se sont avérées être les conditions les plus stables pour ce type de manipulation et les changements métaboliques y sont plus remarquables (Delporte *et al.*, 2015 – annexe III). Cette technique sera notamment utilisée pour noter la possibilité de l'implication des HCT et HQT de chicorée dans la synthèse de diCQA. En effet, les ARN respectifs seront quantifiés dans des conditions différentielles d'accumulation en diCQA. Ceci permettra de juger de l'identité d'une voie métabolique unique ou ajustée à chaque organe, mais aussi d'observer les différences d'expression des gènes impliqués dans chaque cas.

Chapitre 2 :

**Clonage et caractérisation biochimique de cinq
hydroxycinnamoyltransférases impliquées dans
la synthèse de l'acide chlorogénique chez la
chicorée**

Introduction

Les acyltransférases de la famille des BAHD regroupent des enzymes responsables de l'acylation, dépendante des acyl-CoA, de métabolites spécialisés (St Pierre et De Luca, 2000). Cela résulte en la formation d'esters et d'amides. Les membres de la famille des BAHD sont des enzymes monomériques de masse moléculaire comprise entre 48 et 55 kDa. Le nombre moyen d'acides aminés entrant dans la constitution des protéines est de l'ordre de 445. Actuellement, tous les membres de la famille apparaissent être localisés dans le cytosol. En effet, aucune séquence ne semble contenir de peptide d'adressage particulier qui pourrait les envoyer dans divers organelles (D'Auria, 2006). La séquence protéique des acyltransférases de cette famille présente deux régions hautement conservées : un motif HXXXD(G), motif directement impliqué dans l'accrochage du substrat à la protéine, et un motif DFGWG (St Pierre et De Luca, 2000 ; Petersen *et al.*, 2009). Le domaine HXXXD(G) est situé près du centre de la séquence de chaque enzyme et est partagé par plusieurs familles d'acyltransférases qui utilisent les thioesters de coenzyme A comme donneurs d'acyle. Le motif DFGWG est, quant à lui, situé près de la zone C-terminale de la protéine. Des délétions ou modifications sur l'une de ces portions de séquence provoquent une diminution marquée de l'activité enzymatique (Bayer *et al.*, 2004). De plus, il apparaît que d'autres régions protéiques pourraient être également importantes pour l'activité catalytique, tel que le motif LSXTLXXXYYXXXG (St Pierre et De Luca, 2000 ; Aharoni *et al.*, 2000). Chez le melon, une substitution d'un seul acide aminé (Alanine en Thréonine – position 268) permet de rendre fonctionnelle une enzyme, la CmAAT2, qui ne l'était pas naturellement. En effet, toutes les enzymes de la famille des AAT (alcool acyltransférase), sous-famille des BAHD, de cette espèce sont actives sauf la CmAAT2 (El-Sharkawy *et al.*, 2005). La famille des AAT regroupe des enzymes clés de la biochimie aromatique et est une famille de protéines présentes chez les micro-organismes, levures, champignons et les végétaux.

Les acyltransférases de la famille des BAHD divergent d'un gène ancestral commun et sont le résultat de duplications et mutations de ce dernier. Des études phylogénétiques ont permis d'identifier 5 clades majeurs : les clades I, II, III, IV et V (D'Auria *et al.*, 2006 ; Tuominen *et al.*, 2011) (figure 2.1). Plus récemment, les clades I, III et V ont été subdivisés en deux groupes, a et b (Tuominen *et al.*, 2011).

Le clade I regroupe des membres impliqués dans la modification des glucosides phénoliques, principalement des anthocyanes. Malgré tout, des enzymes de ce clade peuvent être associées à d'autres rôles biochimiques : par exemple, la NtMAT1 (malonyltransférase) est impliquée dans la

synthèse de naphthol malonylé et de glucosides de flavonoïdes (Taguchi *et al.*, 2005). La plupart des enzymes de ce clade possèdent un motif en acides aminés en plus des deux autres : YFGNC (Suzuki *et al.*, 2002).

Le clade II regroupe deux membres pour le moment : Glossy2 de *Zea mays* et CER2 d'*Arabidopsis thaliana*. Ces enzymes sont impliquées dans l'extension des parois épicuticulaires qui sont importantes pour le contrôle des pertes en eau des tissus aériens et pour la protection contre les attaques de pathogènes. Néanmoins, CER2 pourrait jouer davantage un rôle régulateur plutôt qu'un rôle biosynthétique (Costaglioli *et al.*, 2005, D'Auria, 2006).

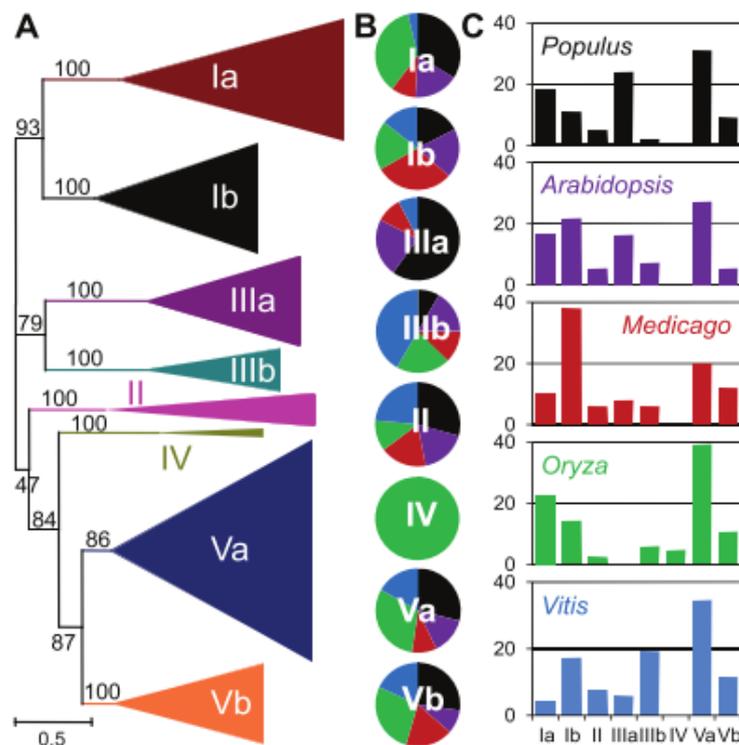


Figure 2.1 : Phylogénie et distribution des acyltransférases de la famille des BAHD (d'après Tuominen *et al.*, 2011)

A : arbre phylogénique des acyltransférases biochimiquement caractérisées et des protéines hypothétiques de la famille des BAHD chez *Arabidopsis*, *Medicago*, *Oryza*, *Populus* et *Vitis*.

B : Pourcentage au sein de chaque clade des acyltransférases à travers les 5 genres de végétaux.

C : Pourcentage des acyltransférases pour chaque clade au sein d'un genre

La majorité des membres du clade III accepte une grande variété de substrats alcooliques, bien qu'ils utilisent l'acétyl-CoA comme donneur d'acyle principal, et sont capables de produire un large panel d'esters volatils. Une sous-famille de ce clade, la clade IIIb, inclut des acyltransférases impliquées dans la modification des alcaloïdes, tels que la vindoline et la thébaine, précurseur de la morphine (St

Pierre *et al.*, 1998 ; Grothe *et al.*, 2001 ; Laflamme *et al.*, 2001). La deuxième sous-famille la plus importante, la clade IIIa, est constituée d'acyltransférases qui sont impliquées dans la biosynthèse d'esters volatils dans les fleurs et les fruits mûrs (Dudareva *et al.*, 1998 ; Beekwilder *et al.*, 2004). L'enzyme RhaAT1 appartient à cette sous-famille et produit l'ester d'acétyle de géraniol chez *Rosa hybrida* (Shalit *et al.*, 2003).

Une enzyme constitue le clade IV : l'agmatine *N*-hydroxycinnamoyltransférase (ACT). Cette enzyme est une acyltransférase de la famille des BAHD qui a la capacité d'acyler un azote pour former l'amide correspondant. La séquence d'ACT contient le motif HXXXD commun à toutes les BAHD mais possède le deuxième motif DFGWG légèrement modifié avec un tryptophane à la place d'une glycine (Burhenne *et al.*, 2003).

Enfin, le clade V peut se subdiviser en deux sous-groupes. Un premier clade, dit clade Va, est composé principalement d'enzymes impliquées dans la formation d'esters volatils. Les enzymes d'un deuxième clade, le clade Vb, utilisent l'hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA comme donneur d'acyl. Cette catégorie inclue les enzymes HCT et HQT, responsables de la formation d'esters d'hydroxycinnamoyl quinate/shikimate (Niggeweg *et al.*, 2004 ; Hoffmann *et al.*, 2003). Ces enzymes jouent un rôle crucial dans la formation d'intermédiaires de la voie de synthèse de la lignine (Hoffmann *et al.*, 2005).

Chez la chicorée, aucune caractérisation de HCT ou de HQT, et plus généralement d'enzymes de la famille des BAHD, n'a été effectuée auparavant. Dans notre volonté d'investiguer la voie de biosynthèse des acides chlorogéniques, nous avons donc dans un premier temps identifié des séquences candidates pour de telles acyltransférases. Ces candidats ont ensuite été clonés et caractérisés d'un point de vue moléculaire et biochimique. De plus, leur expression génique respective a été évaluée par qRT-PCR dans des conditions contrastées d'accumulation chez des cultures cellulaires de racines. Pour cette dernière manipulation, il a fallu au préalable optimiser la méthode *via* la validation de gènes de référence. Ce travail auquel j'ai participé a fait l'objet d'une manuscrit soumis pour publication (Delporte *et al.*, 2015 – annexe III). Les résultats d'identification et de caractérisation biochimique des HCT et HQT ont donné lieu à la rédaction d'une publication qui sera prochainement soumise et constitue le corps de ce chapitre. Quelques résultats complémentaires sont présentés en fin de chapitre.

Publication

**Identification and characterization of five BAHD acyltransferases involved in
hydroxycinnamoyl ester metabolism in chicory**

Guillaume Legrand, Marianne Delporte, Chahinez Khelifi, Adeline Harant, Christophe Vuylsteker, Monika Mörchen, Philippe Hance, Jean-Louis Hilbert and David Gagneul*

Identification and characterization of five BAHD acyltransferases involved in hydroxycinnamoyl ester metabolism in chicory

Guillaume Legrand, Marianne Delporte, Chahinez Khelifi, Adeline Harant, Christophe Vuylsteker, Monika Mörchen, Philippe Hance, Jean-Louis Hilbert and David Gagneul*

EA 7394 Agro-food and Biotechnology Research Institute, Charles Viollette Research Institute, University Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

e-mail address of authors:

guillaume.legrand88@gmail.com

marianne.delporte@gmail.com

chahinez.khelifi@gmail.com

adeline.harant@gmail.com

Christophe.Vuylsteker@univ-lille1.fr

Mouika.Morchen@univ-lille1.fr

Philippe.Hance@univ-lille1.fr

jean-louis.hilbert@univ-lille1.fr

david.gagneul@univ-lille1.fr

*Corresponding author:

David Gagneul

e-mail david.gagneul@univ-lille1.fr

tel +33 (0) 320434021

Abstract (350 words)

Background: *Cichorium intybus*, an *Asteraceae*, accumulates four main caffeic ester with important significance for human health mainly due to their antioxidant effects. According to current knowledge, biosynthesis of these compounds may be highly interconnected. Recent reports indicate that their synthesis could rely on acyl-CoA-dependent acyltransferases belonging to the well-known BAHD protein superfamily. In this study, we aim at a better understanding of the caffeic ester metabolism in chicory.

Results: Detailed metabolic analysis reveals that *C. intybus* predominantly accumulates caffeic ester of tartaric acid in leaves, i.e. caftaric and chicoric acids, whereas isochlorogenic acid (diCQA) was almost exclusively accumulated in roots. Chlorogenic acid (CQA) was equally distributed in all organs. Interestingly distribution of the 4 compounds was related to leaf age. Expanding leaves contain the highest contents of phenolic acids whereas the oldest leaves exhibit lowest contents. Induction with methyljasmonate (MeJA) of root cell suspension culture results in an increase of CQA and diCQA contents. In an attempt to decipher the pathways involved in the biosynthesis of these compounds, we screened expressed sequence tag libraries using members of the BAHD family identified in *Arabidopsis* and Tobacco as baits. We identified 5 genes putatively involved in CQA biosynthesis. The full-length cDNAs of these genes were isolated. Predicted amino acid sequence analyses revealed typical features of BAHD family members. Biochemical characterization of the recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* showed that 2 genes encode HCTs (hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferases, HCT1 and HCT2) whereas 3 genes encode HQTs (hydroxycinnamoyl-CoA:quinic acid hydroxycinnamoyltransferases, HQT1, HQT2 and HQT3). While HCTs showed higher affinity for shikimate over quinate, HQTs preferred quinate over shikimate. These results totally agreed with the phylogenetic analysis done with the predicted

amino acid sequences. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression indicated that HQT3 might be more directly associated with CQA accumulation in cell culture in response to MeJA elicitation.

Conclusions: Five acyltransferases involved in the biosynthesis of CQA and related compounds in *C. intybus* have been isolated and characterized. This work may contribute to a better understanding of the genetic basis of the phenylpropanoid biosynthesis.

Keywords (3-10)

Cichorium intybus, acyltransferases, caffeic acid esters, chlorogenic acid

Background

Plants accumulate a wide range of specialized metabolites with a large diversity of chemical types. Three classes are distinguished: terpenes, nitrogen containing compounds including alkaloids, and phenolic compounds. The latter also known as polyphenols are recognized for their health benefit effects. Plant phenolics are the most important dietary antioxidants. They have drawn increasing attention due to their marked effect in the prevention of various oxidative stress associated diseases. Among them, hydroxycinnamic acid derivatives, particularly hydroxycinnamoyl esters, are widely distributed in the plant kingdom [1]. For example, a caffeoyl moiety can be combined to quinic acid to form either monocaffeoylquinic acid (chlorogenic acid, CQA) as found in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) or in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [2] or dicaffeoylquinic acid (isochlorogenic acid, diCQA) as it is the case in coffee (*Coffea spp.*), tomato or sweet potato (*Ipomea batatas* L.) [3–5]. In lettuce (*Lactuca sativa* L.) or red clover (*Trifolium pratense* L.), the caffeoyl group is attached to malic acid to form phaselic acid [6, 7]. Esters of tartaric acid such as monocaffeoyltartaric acid (caftaric acid, CTA) are also found in grape vine (*Vitis vinifera* L.), perennial peanut (*Arachis glabrata* L.) and several members of the *Asteraceae* like purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) which also contains dicaffeoyltartaric acid (chicoric acid, diCTA) [8–10]. Chicory (*Cichorium intybus* L.) is a member of the *Asteraceae* family used for a long time in traditional medicine. This is notably due to the accumulation of high-value health promoting compounds such as the four previously described caffeic ester derivatives i.e. CQA, diCQA, CTA and diCTA [11][12]. Indeed, many health benefit effects are attributed to these molecules when isolated. For instance, immunostimulatory properties have been shown for diCTA as well as antihyaluronidase activity and protective effect on the free radical-induced degradation of collagen [13]. In addition to their notable dietary role, these molecules are important compounds with multiple roles in plants. These compounds are involved in

plant protection against abiotic (UV, oxidative stress) and biotic (insects, pathogens) stresses. Indeed, in *V. vinifera*, CTA accumulation was shown to be related to the presence of UV radiation supporting a putative role of this molecule in UV protection [14]. In globe artichoke (*Cynara cardunculus* L.), it was also hypothesized that diCQA could play a role in UV protection [15]. Increased CQA accumulation in *S. lycopersicum* was shown to improve antioxidant activity and resistance to infection by *Pseudomonas syringae* [2]. Furthermore, CQA as well as feruloylquininate were also identified as protective agents against thrips in *Chrysanthemum* [16].

A better understanding of CQA, diCQA, CTA and diCTA metabolic pathways is of paramount importance to develop agronomic, genetic, or biotechnological tools for higher production of these high-value bioactive compounds. In this context, *C. intybus* could be a model species considering that the metabolism of these molecules is highly interconnected (Fig. 1). The esters are synthesized *via* the phenylpropanoid pathway. Most enzymes involved in the first part of this pathway are known for years [17]. The entry point of this pathway is the aromatic amino acid phenylalanine (Phe) arising from the shikimate pathway. Deamination of Phe by Phe ammonia lyase (PAL) leads to cinnamic acid. Cinnamate-4-hydroxylase and 4-coumarate coenzyme A (CoA) ligase (4CL) generate p-coumaroyl-CoA from cinnamic acid. Thereafter hydroxycinnamoyltransferases convert the CoA-thioester to coumaroylquininate or coumaroylshikimate which is subsequently hydroxylated by p-coumarate-3'-hydroxylase (C3'H) to form the caffeoyl derivatives. Two types of transferases have been identified. Hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferases (HCTs) use shikimate as a preferred acyl acceptor whereas hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyltransferases (HQTs) exhibit preference for quinate [4]. Experimental evidences have shown that HCTs may be involved in the synthesis of precursors for lignin synthesis whereas HQTs may be directly involved in CQA

synthesis towards its accumulation [2, 18]. Both enzyme activities are fully reversible that is the quinate or shikimate derivatives can be converted in presence of CoA to the free acid plus coumaroyl-CoA or caffeoyl-CoA. Recently a caffeoylshikimate esterase (CSE) that releases caffeic acid and shikimate has been identified in *Arabidopsis* (Fig. 1) [19]. HCTs and HQTs belongs to the BAHD superfamily of plant-specific acyl-CoA dependent acyltransferases [20–23]. The name is derived from the first four enzymes identified and biochemically characterized (BEAT, benzylalcohol *O*-acetyltransferase; AHCT, anthocyanin *O*-hydroxycinnamoyltransferase; HCBT, anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase; DAT, deacetylvindoline 4-*O*-acetyltransferase) [20, 21]. In *I. batatas*, diCQA arises from the transfer of a caffeoyl group from a CQA to a second CQA [24]. An enzyme called chlorogenic acid: chlorogenate caffeoyl transferase catalyzes this reaction. The protein was partially characterized but the corresponding gene has not been identified [24]. Recent study identified a HCT from *Coffea canephora* able to convert CQA to diCQA [4]. A *S. lycopersicum* HQT was also shown to be involved in the formation of diCQA from CQA [5]. In *A. glabrata* and *Equisetum arvense*, it was shown that caftaric acid is synthesized through condensation of a caffeoyl-CoA with tartaric acid which is a typical mechanism of the BAHD family members [25, 26]. Furthermore chicoric acid was demonstrated *in vitro* to be synthesized by transfer of a caffeoyl moiety of caffeoyl-CoA to caftaric acid in *E. arvense* [25]. Pathways involved in CTA and diCTA are only supported by biochemical experiments and to date, no molecular data are available. To summarize, all these molecules could arise through the action of acyltransferases of the BAHD family.

In chicory, knowledge on the genetic control of these metabolic pathways is still limited. We report in this paper the isolation, cloning and the biochemical characterization of 5 full-length cDNA sequences encoding HCTs or HQTs in *C. intybus*. Public expressed sequence tag (EST) databases were screened for BAHD putative members. Five genes with strong

homology with known HCTs or HQTs were identified and cloned. Phylogenetic analysis was confirmed by biochemical analysis of the recombinant proteins. That is, HCTs prefer shikimate as an acyl acceptor whereas HQTs prefer quinate. Following induction of cell suspension culture of chicory with methyljasmonate (MeJA), we show that the expression of one of the identified HQTs i.e. HQT3 and of the 2 HCTs were induced and probably responsible for the CQA accumulation observed in these conditions.

Results

Profiling of the main caffeic acid esters in chicory tissues

The amounts of CQA, diCQA, CTA and diCTA were first determined in 6 week-old chicory seedlings grown hydroponically in half strength MS medium (Murashige and Skoog medium). Methanolic extracts of roots or leaves were analyzed by HPLC-UV. Typical chromatograms are presented in Fig. 2 and quantifications indicated in Table I. Notably, only trace amounts of diCTA and no CTA could be detected in roots whereas diCQA was poorly abundant in leaves. CQA, a putative precursor of all 3 other molecules, did not allow to discriminate between organs. In roots, diCQA was the most abundant compound ($6.7 \pm 3.0 \mu\text{mol.g}^{-1}$ DW i.e. 63.2 % of total caffeate derivatives) while in leaf, diCTA was the most abundant ($18.9 \pm 2.2 \mu\text{mol.g}^{-1}$ DW i.e. 63.6% of total caffeate derivatives). Detailed analyses show that chicory accumulates 3-CQA (i.e. chlorogenic acid according to the actual CAS nomenclature), one of the CQA isomers and 3,5-diCQA one of the diCQA isomers. However, 5-CQA (i.e. neochlorogenic acid) could also be detected in trace amount in chicory roots but not in leaves. Overall leaf phenolic contents were about 3 times higher than those in roots. To extend our analysis, leaves of 4 week-old seedlings were separately collected and analyzed. Interestingly, levels of CTA, diCTA, 3-CQA and 3,5-diCQA were dependent on leaf ages

(Fig. 3). The highest contents were found in the youngest leaves. For instance, CTA content was 7 times higher in the youngest leaves than in the older ones.

As an inducer of jasmonates, MeJA regulates a diverse set of physiological and developmental processes. It has been observed that addition of MeJA can significantly alter the production of specialized metabolites [27, 28]. Phenylpropanoid compounds were shown to accumulate in *Nicotiana tabacum* cell cultures upon MeJA elicitation [29]. In our lab, we have shown that elicitation of chicory cell cultures with MeJA readily enhances 3-CQA and 3,5-diCQA production and accumulation (unpublished results). Thus, chicory root cell cultures were treated for 24 h with 50 μ M MeJA diluted in ethanol (EtOH) and the contents of 3-CQA and 3,5-diCQA analyzed (Fig. 4). As expected, upon addition of MeJA, the concentrations of these 2 compounds were 2.2 fold higher than in the control cells grown in the presence of the sole ethanol. The levels of 3-CQA and 3,5-diCQA were 1.5 and 11.8 μ mol.g⁻¹ DW, respectively in the cells treated with EtOH and 3.3 and 25.6 μ mol.g⁻¹ DW in the cells elicited with MeJA. As previously described in chicory roots, 5-CQA was also detected in this material but, surprisingly, in quantity quite similar to that of 3-CQA (Fig. 4A and 4B). Despite a 5-CQA quantity more stable than these of the other quantified phenolics, significant difference between elicited cells and cells treated with EtOH is notable (4.4 and 2.5 μ mol.g⁻¹ DW respectively). No CTA or diCTA could be detected in this suspension culture. This is in agreement with the seedling data that show tissue specific distribution of these polyphenols.

Identification, cloning and sequence analysis of 5 hydroxycinnamoyl transferase genes in chicory

To identify sequences of putative members of the BAHD family from chicory, the amino acid sequences of HCT from *Arabidopsis thaliana* i.e. AtHCT (GenBank accession AED95744)

and of HQT from *N. tabacum* i.e. NtHQT (GenBank accession CAE46932) were used as the queries in a tBLASTn search of the EST sequences publicly available. The ESTs showing the highest similarity to either AtHCT or NtHQT were selected for further analysis. This search identified 15 ESTs (GenBank accessions EH696409, FL673648, DT213617, EH686422, EH674585, EH692212, FL682645, EH691266, EH677208, EH692526, EH705216, EH706054, EH682505, EH692394 and EH701989) that were further assembled in 4 contigs. According to the homology of the predicted amino acid sequences to either the AtHCT or NtHQT, they were named *HCT1*, *HCT2* (GenBank accession KT222892), *HQT1* (GenBank accession KT222893) and *HQT2* (GenBank accession KT222894). Examination of predicted amino acid sequences showed that *HCT2*, *HQT1* and *HQT2* were the full-length cDNA. No additional overlapping ESTs were identified to extend the *HCT1* sequence. For this reason, a bacterial artificial chromosome library was screened and one positive clone was identified [30]. The 5' sequence was extended by sequencing to get the full-length sequence (GenBank accession KT222891). To get more putative sequences, the recently released 454 reference assemblies of *C. intybus* was interrogated and an additional HQT, *HQT3* (comp5746_C0-seq1, GenBank accession KT222895), was identified [31].

The *HCT1* coding region shares 81% nucleotide sequence identity with that of *HCT2*. *HQT2* coding region shares 74% and 66% nucleotide sequence identity with that of *HQT3* and *HQT1*, respectively. *HQT1* and *HQT3* share 67% nucleotide sequence identity. Comparison of *HCT* coding region with that of *HQT* gave a maximum score of 61%. Gene sizes were 1305 bp, 1293 bp, 1317 bp, 1320 bp and 1326 bp for *HCT1*, *HCT2*, *HQT1*, *HQT2* and *HQT3*, respectively. *HCT1* encodes a protein of 434 amino acids with a calculated molecular mass of 48.1 kDa. The peptide product of *HCT2* consists of 430 amino acid residues and has a predicted molecular mass of 47.7 kDa. The 438-amino acid protein encoded by *HQT1* has a

predicted molecular mass of 48.6 kDa. *HQT2* and *HQT3* encode proteins of 439 and 441 amino acids, respectively, with calculated molecular masses of 48.6 kDa and 48.8 kDa.

Phylogenetic analysis of predicted amino acid sequences confirm our first analysis i.e. HCT1 and HCT2 group together with biochemically characterized HCTs whereas HQT1, HQT2 and HQT3 group with characterized HQTs (Fig. 5A). All 5 proteins contain the two conserved motifs, HXXXDG and DFGWG that are observed among BAHD acyltransferases (Fig. 5B). The first one, implicated in the active site, is strongly conserved whereas the second one could be slightly altered. HCT1 and HCT2 contain the same motif HHAADG in the middle part of the protein whereas HQT1 and HQT2 share the motif HTLSDG. For HQT3, a unique motif HTLADG was found. In the C-terminal part of the proteins, all proteins harbor the same DFGWG motif except HQT2 which amino sequence is DFGYG. Analyses of genomic sequences show that *HCT1*, *HQT1*, *HQT2* and *HQT3* exhibit a single intron whereas *HCT2* have none. The introns are 242 bp, 1203 bp, 1293 bp and 873 bp in length for *HCT1*, *HQT1*, *HQT2* and *HQT3*, respectively. They harbor the features of the conserved intron « Q » found in many members of the BAHD family [20]. The intron position in the coding region corresponds to an insertion between a Gln residue and a Val residue of the predicted amino acid sequences (Fig. 5B).

Expression of HCTs and HQTs in Escherichia coli and evaluation of their activity in vitro

To study the catalytic activities of the chicory HCT and HQT proteins and to confirm the phylogenetic analysis, their entire coding regions were cloned into pDEST-17 vectors for expression in *Escherichia coli*. After transformation of *E. coli* host strain BL21-codon plus (DE3)-RIL, expression was induced with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Proteins were then recovered in the soluble fractions and purified using His-Trap Ni columns. Presence, identity and purity of the recombinant proteins were then validated by SDS-PAGE

and by immunoblot analysis using anti-His antibody (Fig. 6). All proteins give a band at the expected molecular mass i.e. about 50 kDa (His₆-HCTs or His₆-HQTs). Activities of recombinant proteins were measured *in vitro* using either coumaroyl-CoA or caffeoyl-CoA as acyl donor and quinate or shikimate as the acceptor of the transferase reaction. The products of the reaction were analyzed by HPLC. In the presence of the enzymes, coumaroylquininate, coumaroylshikimate, caffeoylquininate and caffeoylshikimate were detected in the reaction mixtures (data not shown). No product could be detected in the absence of proteins or in the absence of the free acid. Each reaction product was identified by comparing its retention time and absorbance spectrum with authentic standards or isolated compounds. To verify their substrate preference, reaction mixtures containing 5 mM quinic acid plus 5 mM shikimic acid were run in the presence of 0.4 mM caffeoyl-CoA or 0.4 mM coumaroyl-CoA. When both acids were provided at the same concentration, HCTs mostly produce caffeoylshikimate or coumaroylshikimate whereas HQTs produce predominantly caffeoylquininate or coumaroylquininate (Table II). These results clearly demonstrate that HCTs from chicory strongly prefer shikimic over quinic acid whereas HQTs prefer quinic acid. These biochemical data support the phylogenetic tree and are in accordance with previously published reports dealing with HCTs or HQTs from other species. In additional experiments, we have shown that HCTs and HQTs can also use feruloyl-CoA and cinnamoyl-CoA as acyl donors (not shown). The activity of HCTs and HQTs towards other potential substrates (spermidine, tartaric acid) was also tested but no activity was observed in our experimental conditions.

These reactions were shown to be fully reversible in other systems [18, 32, 33]. In our case, when recombinant HCTs or HQTs were incubated in the presence of CQA and CoA, caffeoyl-CoA was detected (data not shown).

An HCT from *C. canephora* and an HQT from *S. lycopersicum* were shown to convert CQA in diCQA [4, 5]. The ability of the recombinant chicory acyltransferases to catalyze this reaction was checked. Enzymes were incubated in the presence of CQA and caffeoyl-CoA. No activity could be detected in the reaction mixture in our experimental conditions (data not shown).

Kinetic parameters of recombinant proteins

Kinetic parameters of the enzyme were determined using caffeoyl-CoA or coumaroyl-CoA as the acyl-CoA donors and either quinate for HQTs or shikimate for HCTs as acyl acceptors (Table III). The reactions showed typical Michaelis-Menten kinetics with increasing concentrations of acyl donor or acyl acceptor. The K_m values and V_{max} values were calculated from triplicates by the Lineweaver-Burk method. All enzymes except HCT1 showed better affinity for caffeoyl-CoA than for coumaroyl-CoA. As shown in Table III, in the presence of saturating coumaroyl-CoA, HCT1 and HCT2 have better affinity for shikimate than in the presence of saturating caffeoyl-CoA (for HCT1, $K_m = 0.32 \pm 0.04 \mu\text{M}$ and $8 \pm 0.63 \mu\text{M}$, respectively). In terms of V_{max}/K_m ratios, both HCT1 and HCT2 have better efficiency with coumaroyl-CoA. For example, HCT1 has a V_{max}/K_m ratio of $119 \mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ with caffeoyl-CoA at saturating concentration and of $450 \mu\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\mu\text{M}^{-1}$ with coumaroyl-CoA. Affinities of HQT2 and HQT3 for quinate are about the same with saturating concentrations of caffeoyl-CoA or coumaroyl-CoA (Table IIIB). HQT1 has a higher affinity for quinate in the presence of saturating caffeoyl-CoA than in the presence of coumaroyl-CoA ($K_m = 0.16 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and $4.49 \pm 0.43 \mu\text{M}$, respectively).

Chicory HCTs and HQTs are differentially expressed

The expression pattern of chicory *HCTs* and *HQTs* were examined using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in different parts of chicory seedlings shown to accumulate contrasted levels of phenolic compounds and in culture cells treated or not with MeJA. Primers were design to detect specifically *HCT1*, *HCT2*, *HQT1*, *HQT2* or *HQT3*. Primer efficiency was first assessed. All genes were amplified specifically and no cross amplification was found. The expression data of the target genes were normalized to *CLATH* and *SAND* mRNA levels for seedling experiments and to *TIP41* and *PP2AA2* mRNA levels for cell culture experiments in agreement with previous work done on the same plant materials [34].

The five genes were expressed in all of the investigated tissues (roots, old leaves, intermediate leaves and young leaves) (Fig. 7A). Each gene shows a tissue-specific pattern of accumulation. Nevertheless no significant difference could be detected. *HCT1* is highly expressed in roots whereas *HCT2* and *HQT1* are highly expressed in the old leaves, *HQT2* in the intermediate leaves and *HQT3* in the youngest leaves.

In culture cells, MeJA treatment up-regulates the mRNA abundance of *HCT1*, *HCT2* and *HQT3* (Fig 7B). For these 3 genes, mRNA abundance in MeJA treated cells was about 2-fold, 1.5-fold and 3-fold higher respectively than in control cells. The expression of the two other acyltransferases (*HQT1* and *HQT2*) was rather stable in all investigated conditions. The relatively high-level expression of *HQT3* in MeJA treated cells is consistent with its putative role in chlorogenic acid production and correlates with the metabolic data.

Discussion

Hydroxycinnamoyl esters play an essential role in plant physiology especially in plant-environment interactions. Furthermore, these compounds have significance in the area of human health. They are present in fruit and vegetable and they represent important

antioxidant molecules with multiple applications for cosmetic, pharmaceutical and food industries. Industrial chicory accumulates 4 main caffeic esters i.e. CQA, diCQA, CTA and diCTA (this work, [11] [12]). In northwestern Europe, India, South Africa and Chile, roots of chicory are widely used for inulin extraction. But roots are also processed to prepare dried or roasted products and beverages. As a food product, one can conceive that improvement of the contents of these high-value caffeic ester compounds represent a challenge for breeders. Moreover, these molecules are known to have multiple pharmaceutical properties. The extraction of these molecules from plant sources does not result in quantities large enough to meet the increasing market demands. Moreover extraction and purification of these natural products requires laborious processes, are time consuming and expensive. Furthermore, abundance of the compounds in the plant material is not constant. In this context it could be interesting to produce these molecules in heterologous hosts such as the microbial factories *E. coli* or the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. For this purpose, the optimization of the caffeic ester production will require a full understanding of the relevant biosynthetic pathways.

Evidences in other species prompted us to focus our analysis on the BAHD superfamily of plant-specific acyl-CoA dependent acyltransferases. Members of this family are distinguished by the presence of two highly conserved motifs: HXXXDG in the middle part of the protein and DFGWG in the C terminus part of the protein. Public EST databases were searched for sequences related to AtHCT and NtHQT belonging to the Clade Vb of the BAHD family. This clade was shown to contain proteins involved in the synthesis of CQA and related compounds as well as more diverse products like phaelic acid, triferuloyl spermidine and feruloyl glycerol [35–37]. This search allowed us to identify 5 sequences. The full-length open reading frames (ORFs) were cloned. On the basis of their high similarity with the already functionally characterized hydroxycinnamoyl-transferase sequences (HCT and HQT)

and of the phylogenetic analysis, they were named *HCT1*, *HCT2*, *HQT1*, *HQT2* and *HQT3*. The resulting ORFs encode five proteins with calculated molecular mass of about 48 kDa. This is in agreement with the molecular mass calculated for multiple BAHD members [21]. Phylogenetic clustering can give a clue of the function. Nevertheless function need to be established on a biochemical demonstration of activity. Clade Vb of the BAHD contain members with very versatile catalytic specificities [35–37]. All five proteins were shown to be able to use either p-coumaroyl-CoA or caffeoyl-CoA as an acyl donor and quinic acid or shikimic acid as an acyl acceptor. In addition, we showed that *HCT1* and *HCT2* exhibit preference for shikimate, whereas *HQT1*, *HQT2* and *HQT3* prefer quinate as a substrate. Biochemically characterized HCTs or HQTs isolated and cloned in other species share the same specificity [18, 38]. This confirms our phylogenetic studies based on predicted amino acid sequences. Kinetic parameters measured in this study are in agreement with other reports. Abilities to catalyze the reverse reactions were also examined and confirmed as found in other species. Neither HCTs or HQTs show activity in the presence of high concentrations of CQA following the experimental conditions described in Moglia *et al.* or in Lallemand *et al.* [5][4]. We assumed that they have no role in the diCQA biosynthesis. It has been shown that a His residue located at position 276 in the *SIHQT* amino acid sequence could be of paramount importance for optimal diCQA synthesis *in vitro* [5]. Alignment of HCT and HQT sequences of chicory with that of *SIHQT* indicated that in all acyltransferase proteins from chicory, the residue equivalent to His276 was a Tyr as in HQT from globe artichoke. Recombinant HQT from globe artichoke only produce traces of diCQA in the presence of CQA. Our data confirm that His276 could play a key role in HCT or HQT activity towards the production of diCQA. Therefore diCQA synthesis may occur by other routes in the *Asteraceae*.

Phenylpropanoid contents usually rise when the plant is submitted to MeJA elicitation. We found out that treatment of chicory cell cultures with MeJA leads to an increase of CQA and diCQA amounts. Furthermore, in contrast to root or leaf extract where only one major isomer of CQA (i.e. 3-CQA) could be detected, in suspension culture, 5-CQA was detected in equivalent quantity to 3-CQA. We observed that treatment of cell cultures with MeJA induces the expression of the genes encoding HQT3 and the 2 HCTs with a stronger induction for *HCT2* and even more for *HQT3*. This suggests the major involvement of HQT3 in the higher production and accumulation of CQA in response to MeJA treatment.

The presence of three genes encoding HQTs and two genes encoding HCTs might relate various independent separations of them during plant evolution. Therefore, in chicory, HQT enzymes and HCT enzymes seem to be encoded by a gene family of at least 3 members and 2 members, respectively. This seems to be a general trend in the *Asteraceae* family since 3 HQTs and 1 HCT were found in artichoke and several members of each family are present in sunflower and in lettuce [38]. The presence of multiple isoforms of each family might ensure an optimization of fluxes towards the accumulation of different metabolites. Especially, in chicory, in addition to CQA accumulation, CQA might serve as a caffeoyl donor for the production of diCQA, CTA and diCTA.

Conclusion

We identified and characterized 5 novel acyltransferases involved in the biosynthesis of CQA and related metabolites in chicory. The recombinant proteins have been produced in *E. coli* and their activity examined *in vitro*. Together with phylogenetic analysis, we showed that 3 of these genes are classified among HQTs whereas 2 are HCTs. Indeed HCTs use shikimate as a preferred acceptor and coumaroyl-CoA as a preferred acyl donor, whereas HQTs use quinate and caffeoyl-CoA as preferred substrates. Furthermore, expression analysis confirms that at

least one HQT and the 2 HCTs could be involved in CQA production towards its accumulation.

This work is the first contribution in the understanding of the genetic basis of the hydroxycinnamate biosynthesis in *C. intybus*. Future research will be devoted to the characterization of the CTA and diCTA biochemical pathway as well as that of the diCQA, which remains incomplete at least in the *Asteraceae*.

Methods

Plant material and growth conditions

Seeds of *Cichorium intybus* var. Orchies were provided by Florimond-Desprez (Cappelle en Pévèle, France). They were germinated for 7 days in Petri dishes on paper humidified with half strength MS medium at pH 6.0 in a growth chamber (16 h light, 8 h dark, 24°C/18°C day/night thermoperiod) The 7-d-old seedlings were then transferred hydroponically to culture pots containing half strength MS solution. The volume of the solution was daily adjusted with fresh medium and the medium completely renewed weekly. For analysis of HCT and HQT mRNA levels, for hydroxycinnamoyl ester contents and for full length cDNA cloning, either 6 week-old or 4 week-old seedlings were individually harvested. Three biological replicates were sampled. Roots and leaves were separately collected and for the 4 week-old seedlings, leaves were divided in 3 samples: old leaves, medium age leaves and newly expanded leaves. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until needed. Chicory cell cultures were prepared as described in [34].

Isolation of full-length cDNA sequences

Putative BAHD members of clade Vb were identified by searching publicly available databases with AtHCT and NtHQT. Full-length cDNAs of CiHCT1, CiHCT2, CiHQT1, CiHQT2 and CiHQT3 were first subcloned into a TA cloning vector (pGEM-T easy, Promega). DNA sequences were amplified by PCR using proofreading polymerase (PrimeSTAR HS DNA polymerase, Takara). The PCR primers designed for these amplifications are listed in Table IV. The sequences of independent clones were determined in their entirety on both strands and the consensus sequences established. One clone per gene was kept and was used for following cloning (pGEMT-easy-HCT1, pGEMT-easy-HCT2, pGEMT-easy-HQT1, pGEMT-easy-HQT2 and pGEMT-easy-HQT3).

Phylogenetic tree of acyltransferases and multiple sequence alignment

HCT and HQT cDNAs from chicory were translated to the corresponding amino acid sequences. Phylogenetic tree and multiple alignments were generated by MEGA5 software.

Expression, purification and in vitro assay of recombinant proteins

Full-length cDNAs of the 5 genes were amplified using the primers listed in table IV. The entry clones (pDONR207-HCT1 or 2 and pDONR207-HQT1, 2 or 3) were obtained through recombination of the PCR products with pDONR207 (Invitrogen). For further expression analysis, the open reading frames were introduced into pDEST17 expression vector (Invitrogen) by LR recombination to produce pDEST17-HCT1 or 2 and pDEST17-HQT1, 2 or 3. Recombinant proteins with an N-terminal 6xHis-tag were expressed in *E. coli* BL21-CodonPlus-(DE3)-RIL cells following induction with 1 mM IPTG. After induction, cells were harvested by centrifugation and pellets stored at -80°C. Cell pellets were resuspended in the extraction buffer (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 7.4) added with 1 mg.mL⁻¹ lysozyme and the suspensions were incubated on ice for 30 min. After sonication on ice, samples were centrifuged (10000xg, 4°C, 30 min) and the supernatants were loaded onto 1 mL HisTrap HP columns (GE Healthcare) and processed according to the manufacturer's procedures. The positive fractions were identified by SDS-PAGE, pooled, desalted with a PD-10 desalting column (Pharmacia), and concentrated using vivaspin sample concentrators with 30 kDa molecular mass cutoff (GE Healthcare). Purified proteins were stored at -20°C until needed.

The standard enzymatic *in vitro* assay for the forward reaction were performed in a volume of 50 µL containing 800 µM acyl donor (hydroxycinnamoyl-CoA), 1 mM acyl acceptor (shikimate or quinate), 0.15 µg of purified enzyme, 50 mM phosphate buffer pH 7.1, and 5 mM MgCl₂. The reactions were incubated at room temperature and stopped by adding 10 µL

formic acid 10%. The reaction mixture were then filtered through a 0.45 μm filter (Pall GHP, VWR) and analyzed by LC-UV. K_m and V_{max} values were determined in triplicates by fitting Michaelis-Menten curves directly using GraphPad-Prism Software.

Enzymatic production and purification of hydroxycinnamoyl-CoA compounds

p-Coumaroyl-CoA, caffeoyl-CoA, feruloyl-CoA and cinnamoyl-CoA were prepared enzymatically from each acid and purified [39, 40]. Purified *A. thaliana* 4-coumarate: CoA ligase 1 (At4CL1) recombinant protein from *E. coli* was used to synthesized the CoA-thioesters following the procedure described by Rautengarten et al. [40]. The plasmid for protein expression was kindly provided by Pr. Sheller (Emeryville, USA). The CoA-thioesters were then purified using a SPE cartridge [39]. Yields were 97%, 90%, 95% and 87% for caffeoyl-CoA, p-coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA and cinnamoyl-CoA, respectively.

gDNA extraction

gDNA was extracted from fully expanded leaves using the Nucleospin Plant II kit (Macherey-Nagel).

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from the different parts of young seedlings using the Nucleospin RNA plant kit (Macherey-Nagel) following the manufacturer protocol that includes a DNase treatment. Total RNA from culture cells was extracted using Tri-reagent and then treated according to the manufacturer's instruction with the Turbo DNA-Free Kit (Applied Biosystem) to remove any traces of genomic DNA. The yield and purity of total RNA were determined using the Experion Automated Electrophoresis System (Bio-Rad). One μg of

DNase treated total RNA was used for cDNA synthesis with the Reverse Transcriptase Superscript III RNase H kit and oligo(dT)₂₀ primer (InVitrogen).

qRT-PCR analysis

Gene specific primers (listed in Table IV) were designed using Primer 3 software using recommended parameters [41] (melting temperature = 60°C ± 1°C; length of 18 to 25 nucleotides; 40%-60% GC; length of amplicon from 60 to 150 base pairs). qRT-PCR was carried out using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Reactions were set up in a 20 µL total volume containing cDNA equivalent to 100 ng of total RNA and 5 µM of each primer. Signals were normalized using geometric mean of *CLATH* and *SAND* mRNA levels for seedling experiments and of *TIP41* and *PP2AA2* mRNA levels for cell culture experiments as described by Delporte *et al.* [34]. Initial denaturation was 95°C for 3 min followed by 40 cycles including 95°C for 10 s and 60°C for 30 s. A standard dissociation protocol was run at the end of each run to ensure that each amplicon was a single product. Each reaction was run in duplicates. Control PCRs were run with non retro-transcribed RNA to check for gDNA contamination. Calculation of relative expression was done according to the PffafL equation [42].

Determination of protein concentrations, SDS-PAGE analysis and immunoblot analysis

Protein concentrations of the extracts were determined using Bio-Rad Protein Assay using bovine serum albumin as a standard. SDS-PAGE and immunoblot analysis was conducted as described elsewhere [43]. The following antibody combination were used for immunodetection: penta-His antibody (Qiagen)/alkaline phosphatase (AP)-conjugate anti-mouse IgG (Promega). To estimate molecular masses, the Precision Plus Protein All blue Standards ladder (Bio-Rad) was used.

HPLC analysis of polyphenols

The lyophilized plant material was powdered and 50 mg were resuspended in 1 mL of a methanol/water/acetic acid mixture (75/23/2, v/v/v) and shaken for 12 h at 4°C. Homogenates were clarified by centrifugation (14000xg, 4°C, 10 min) and 300 µL of supernatant were transferred in a new tube. After addition of 150 µL chloroform and 150 µL water, the suspensions were thoroughly shaken. After centrifugation (14000xg, 5 min, 20°C), the upper phase was collected and passed through a 0.45 µM filter. Five µL aliquots were then analyzed by HPLC-UV. For determination of phenolics contents in chicory, the separation method was as described in Willeman *et al.* [44] . For determination of kinetics parameters, the gradient has been optimized to ensure good separation of free acids, esters and CoA-esters. The elution was performed using a three-solvent system (water (Solvent A), methanol (Solvent B), and acetonitrile (Solvent C) all acidified with 0.1% formic acid) at a flow rate of 1.1 mL.min⁻¹ and an oven temperature of 45°C. Solvent C was kept at 12 % du whole run. The HPLC conditions were 3.5 min isocratic 2 % Solvent B, 2 min gradient to 15 % followed by 1.5 min isocratic Solvent B, 2 min gradient to 30 % and 1 min gradient to 80 % Solvent B. Then, 1.5 min gradient to return to 2 % Solvent B and 9.5 min isocratic re-equilibration at 2 % Solvent B. Phenolics were characterized by cochromatography of pure synthetic compounds and quantified making reference to individual external calibration curves.

Authors' contribution

GL, MD, CK, MM and DG carried out the molecular genetic studies. AH, CV and PH set up the cell culture system and performed preliminary experiments. GL, MD, CK and DG carried out the biochemical experiments. DG and JLH planned and supervised the work. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The present work was financed by a public-private partnership “Groupement d’Intérêt Scientifique” GENOCHIC (EA 7394 Agro-food and Biotechnology Research Institute, Charles Viollette Research Institute, University Lille 1 – Florimond-Desprez Veuve et fils SAS – Leroux SAS). Fundings were also provided by BPI France and the Région Nord Pas-de-Calais to QUALICHIC and GLYCACHIC projects. The authors thank Sylvain Legrand for his helpful advice on bioinformatics and gratefully acknowledge Najia Voedts for cell culture maintenance. GL and MD were supported by a doctoral fellowship from the doctoral school 104 SMRE.

References

1. Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S: **Evolution of rosmarinic acid biosynthesis.** *Phytochemistry* 2009, **70**:1663–1679.
2. Niggeweg R, Michael AJ, Martin C: **Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**:746–754.
3. Kojima M, Kondo T: **An Enzyme in Sweet-Potato Root Which Catalyzes the Conversion of Chlorogenic Acid, 3-Caffeoylquinic Acid, to Isochlorogenic Acid, 3,5-Dicaffeoylquinic Acid.** *Agric Biol Chem* 1985, **49**:2467–2469.
4. Lallemand L a., Zubieta C, Lee SG, Wang Y, Acajjaoui S, Timmins J, McSweeney S, Jez JM, McCarthy JG, McCarthy a. a.: **A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee.** *Plant Physiol* 2012, **160**:249–260.
5. Moglia A, Lanteri S, Comino C, Hill L, Knevitt D, Cagliero C, Rubiolo P, Bornemann S, Martin C: **Dual catalytic activity of hydroxycinnamoyl-CoA quinate transferase from tomato allows it to moonlight in the synthesis of both mono- and dicaffeoylquinic acids.** *Plant Physiol* 2014. 166: 1777-1787.
6. Sullivan M: **A Novel Red Clover Hydroxycinnamoyl Transferase Has Enzymatic Activities Consistent with a Role in Phasic Acid Biosynthesis.** *Plant Physiol* 2009, **150**:1866–1879.
7. Mai F, Glomb MA: **Isolation of Phenolic Compounds from Iceberg Lettuce and Impact on Enzymatic Browning.** *J Agric Food Chem* 2013, **61**:2868–2874.
8. Singleton VL, Zaya J, Trousdale EK: **Caftaric and coutaric acids in fruit of Vitis.** *Phytochemistry* 1986, **25**:2127–2133.
9. Sullivan ML, Foster JL: **Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) contains polyphenol oxidase (PPO) and PPO substrates that can reduce post-harvest proteolysis.** *J Sci Food Agric* 2013, **93**:2421–2428.
10. Perry NB, Burgess EJ, Glennie V, Samples P, E RC: **Echinacea Standardization : Analytical Methods for Phenolic Compounds and Typical Levels in Medicinal Species.** *J Agric Food Chem* 2001, **49**:1702–1706.
11. Kandeler R, Ullrich WR: **Symbolism of plants: examples from European-Mediterranean culture presented with biology and history of art.** *J Exp Bot* 2009, **60**:3973–3974.
12. Bahri M, Hance P, Grec Sébastien, Quillet M-C, Trotin F, Hilbert J-L, Hendriks T: **A “Novel” Protocol for the Analysis of Hydroxycinnamic Acids in Leaf Tissue of Chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae).** *Sci World J* 2012, **2012**:8.

13. Wu C-H, Murthy H, Hahn E-J, Paek K-Y: **Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid.** *Biotechnol Lett* 2007, **29**:1179–1182.
14. Del-Castillo-Alonso M-Á, Diago MP, Monforte L, Tardaguila J, Martínez-Abaigar J, Núñez-Olivera E: **Effects of UV exclusion on the physiology and phenolic composition of leaves and berries of *Vitis vinifera* cv. Graciano.** *J Sci Food Agric* 2014, **95**:409–416.
15. Moglia A, Lanteri S, Comino C, Acquadro A, de Vos R, Beekwilder J: **Stress-Induced Biosynthesis of Dicafeoylquinic Acids in Globe Artichoke.** *J Agric Food Chem* 2008, **56**:8641–8649.
16. Leiss KA, Maltese F, Choi YH, Verpoorte R, Klinkhamer PGL: **Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in *Chrysanthemum*.** *Plant Physiol* 2009, **150**:1567–1575.
17. Vanholme R, Ralph J, Akiyama T, Lu F, Pazo JR, Kim H, Christensen JH, Van Reusel B, Storme V, De Rycke R, Rohde A, Morreel K, Boerjan W: **Engineering traditional monolignols out of lignin by concomitant up-regulation of F5H1 and down-regulation of COMT in *Arabidopsis*.** *Plant J* 2010, **64**:885–897.
18. Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, Legrand M: **Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism.** *J Biol Chem* 2003, **278**:95–103.
19. Vanholme R, Cesarino I, Rataj K, Xiao Y, Sundin L, Goeminne G, Kim H, Cross J, Morreel K, Araujo P, Welsh L, Haustraete J, McClellan C, Vanholme B, Ralph J, Simpson GG, Halpin C, Boerjan W: **Caffeoyl Shikimate Esterase (CSE) Is an Enzyme in the Lignin Biosynthetic Pathway.** *Science (80-)* 2013, **341**:1103–1106.
20. St-Pierre B, Luca V De: **Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification fo the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism.** In *Recent Advances in Phytochemistry. Volume 34.* Edited by Romeo J, Ibrahi R, Varin L, De Luca V. Elsevier Science, Ltd.; 2000:285–315.
21. D’Auria JC: **Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD.** *Curr Opin Plant Biol* 2006, **9**:331–340.
22. Yu X-H, Gou J-Y, Liu C-J: **BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: bioinformatics and gene expression.** *Plant Mol Biol* 2009, **70**:421–442.
23. Tuominen L, Johnson V, Tsai C-J: **Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogs.** *BMC Genomics* 2011, **12**:236.
24. Villegas RJA, Shimokawa T, Okuyama H, Kojima M: **Purification and characterization of chlorogenic acid: chlorogenate caffeoyl transferase in sweet potato roots.** *Phytochemistry* 1987, **26**:1577–1581.

25. Hohlfeld M, Veit M, Strack D: **Hydroxycinnamoyltransferases Involved in the Accumulation of Caffeic Acid Esters in Gametophytes and Sporophytes of Equisetum arvense.** *Plant Physiol* 1996, **111**:1153–1159.
26. Sullivan ML: **Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) leaves contain hydroxycinnamoyl-CoA:tartaric acid hydroxycinnamoyl transferase activity and accumulate hydroxycinnamoyl-tartaric acid esters.** *Planta* 2014, **239**:1091–100.
27. Wasternack C, Hause B: **Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany.** *Ann Bot* 2013, **111**:1021–1058.
28. De Geyter N, Gholami A, Goormachtig S, Goossens A: **Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism.** *Trends Plant Sci* 2012, **17**:349–359.
29. Gális I, Šimek P, Narisawa T, Sasaki M, Horiguchi T, Fukuda H, Matsuoka K: **A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco.** *Plant J* 2006, **46**:573–592.
30. Gonthier L, Bellec A, Blassiau C, Prat E, Helmstetter N, Rambaud C, Huss B, Hendriks T, Berges H, Quillet M-C: **Construction and characterization of two BAC libraries representing a deep-coverage of the genome of chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae).** *BMC Res Notes* 2010, **3**:225.
31. Hodgins KA, Lai Z, Oliveira LO, Still DW, Scascitelli M, Barker MS, Kane NC, Dempewolf H, Kozik A, Kesseli R V, Burke JM, Michelmore RW, Rieseberg LH: **Genomics of Compositae crops: reference transcriptome assemblies and evidence of hybridization with wild relatives.** *Mol Ecol Resour* 2014, **14**:166–177.
32. Comino C, Hehn A, Moglia A, Menin B, Bourgaud F, Lanteri S, Portis E: **The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway.** *BMC Plant Biol* 2009, **9**:13.
33. Comino C, Lanteri S, Portis E, Acquadro A, Romani A, Hehn A, Larbat R, Bourgaud F: **Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L.** *BMC Plant Biol* 2007, **7**:14.
34. Delporte M, Legrand G, Hilbert J-L, Gagneul D: **Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus*.** *Front Plant Sci* 2015, **6**: 651 .
35. Sullivan ML, Zarnowski R: **Red Clover HCT2, a Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: Malate Hydroxycinnamoyl Transferase, Plays a Crucial Role in Biosynthesis of Phaselic Acid and Other Hydroxycinnamoyl-Malate Esters in Vivo.** *Plant Physiol* 2011, **155**:1060–1067.
36. Kim IA, Kim B-G, Kim M, Ahn J-H: **Characterization of hydroxycinnamoyltransferase from rice and its application for biological synthesis of hydroxycinnamoyl glycerols.** *Phytochemistry* 2012, **76**:25–31.

37. Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M: **A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines.** *Plant J* 2009, **58**:246–259.
38. Sonnante G, D'Amore R, Blanco E, Pierri CL, De Palma M, Luo J, Tucci M, Martin C: **Novel Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase Genes from Artichoke Are Involved in the Synthesis of Chlorogenic Acid.** *Plant Physiol* 2010, **153**:1224–1238.
39. Beuerle T, Pichersky E: **Enzymatic Synthesis and Purification of Aromatic Coenzyme A Esters.** *Anal Biochem* 2002, **302**:305–312.
40. Rautengarten C, Baidoo E, Keasling JD, Scheller H V: **A simple method for enzymatic synthesis of unlabeled and radiolabeled hydroxycinnamate-CoA.** *Bioenergy Res* 2010, **3**:115–122.
41. Udvardi MK, Czechowski T, Scheible W-R: **Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR.** *Plant Cell* 2008, **20**:1736–1737.
42. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:2002–2007.
43. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition.* Cold Sprin.; 1989.
44. Willeman H, Hance P, Fertin A, Voedts N, Duhal N, Goossens J, Hilbert J: **A Method for the Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Sesquiterpene Lactone Content in Industrial Chicory Root Foodstuffs.** *Sci World J* 2014, **2014**:1–11.

Figure 1. Putative metabolic pathways involved in hydroxycinnamic acid biosyntheses in plants. Question marks indicate enzymes that have been characterized biochemically but which are not supported by molecular data. PAL: phenylalanine ammonia lyase, C4H: cinnamate 4-hydroxylase, 4CL: 4-coumaroyl CoA ligase, HCT: Hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase, HQT: hydroxycinnamoyl-CoA:quinic acid hydroxycinnamoyltransferase, C3'H: p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase, CSE: caffeoyl shikimate esterase.

Figure 2, Legrand et al.

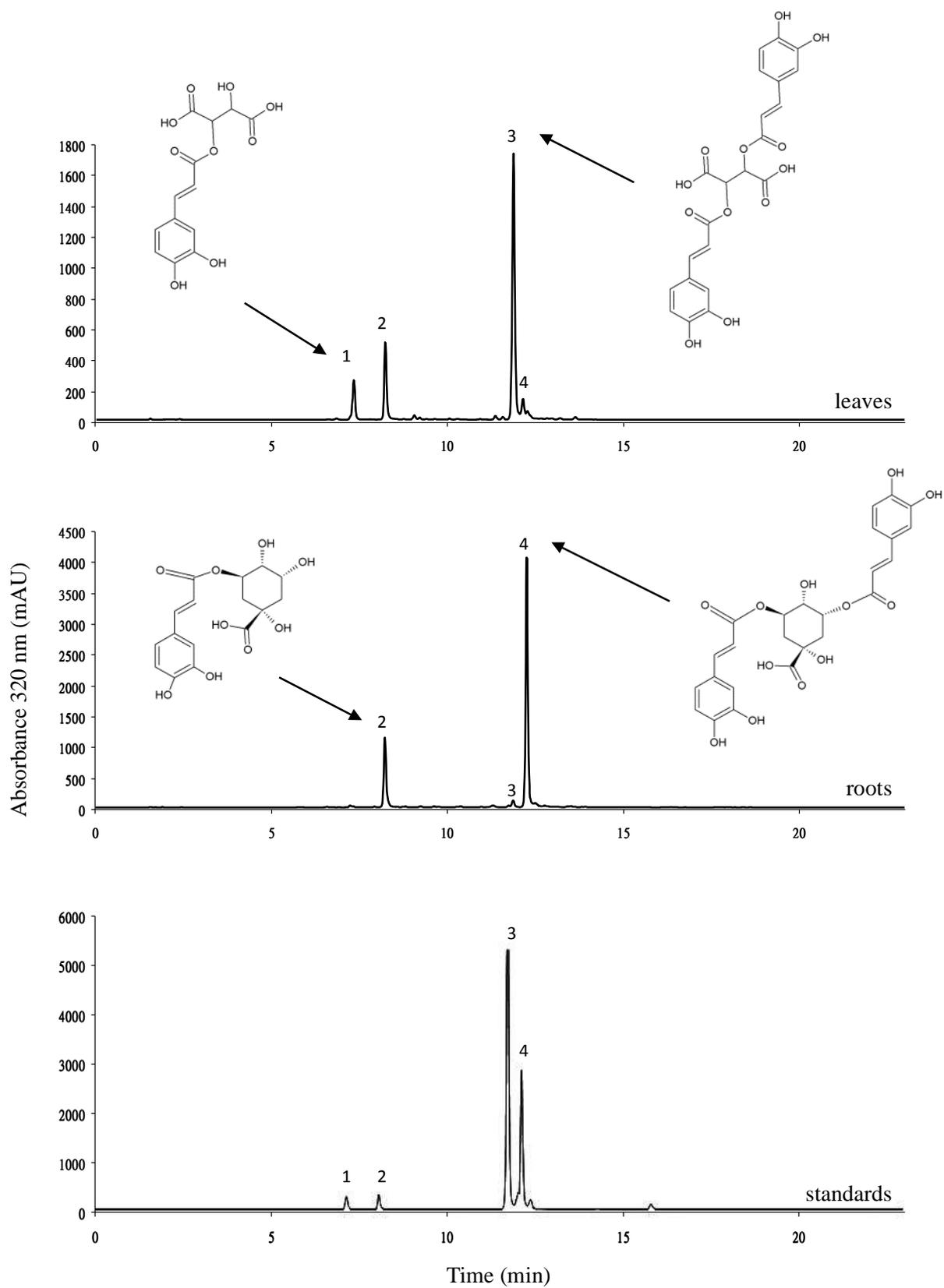


Figure 2. Chromatograms of crude methanolic extracts from leaves and roots of chicory seedlings and of a standard mixture. Products were characterized by their retention times and UV absorbance spectra were recorded with a photodiode array detector. Standards were present at the following concentrations: 1. Caftaric acid, 0.3 mM; 2. Chlorogenic acid, 0.3 mM; 3. Chicoric acid, 1 mM; 4. Isochlorogenic acid, 1 mM

Figure 3, Legrand et al.

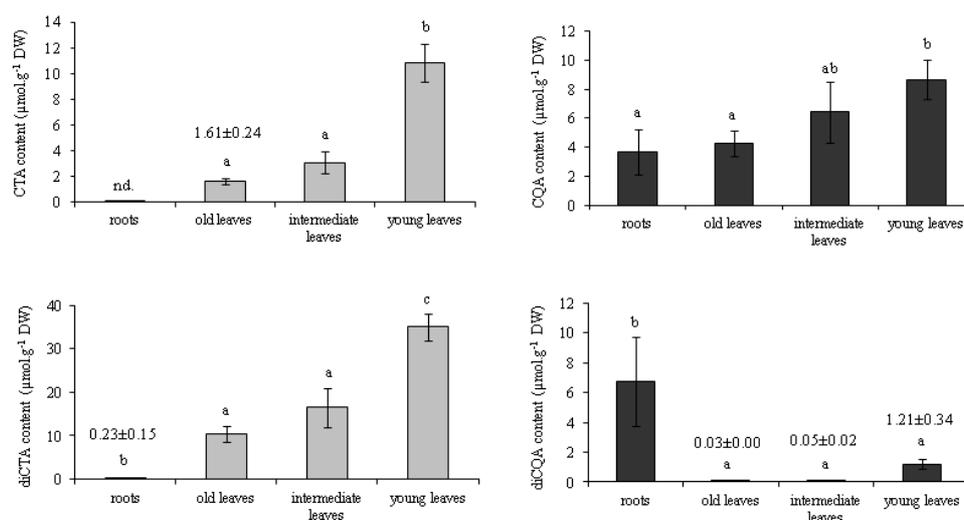


Figure 3. Contents of 3-CQA, CTA, diCTA and 3,5-diCQA in roots and leaves (different ages) of chicory seedlings. Methanolic extracts of roots or leaves of 4-week-old seedlings were analysed by HPLC. The data represent the mean values (\pm SD) of four biologically independent experiments. Different letters in the same histogram indicate significant differences ($P < 0.05$). nd: not detected.

Figure 4, Legrand et al.

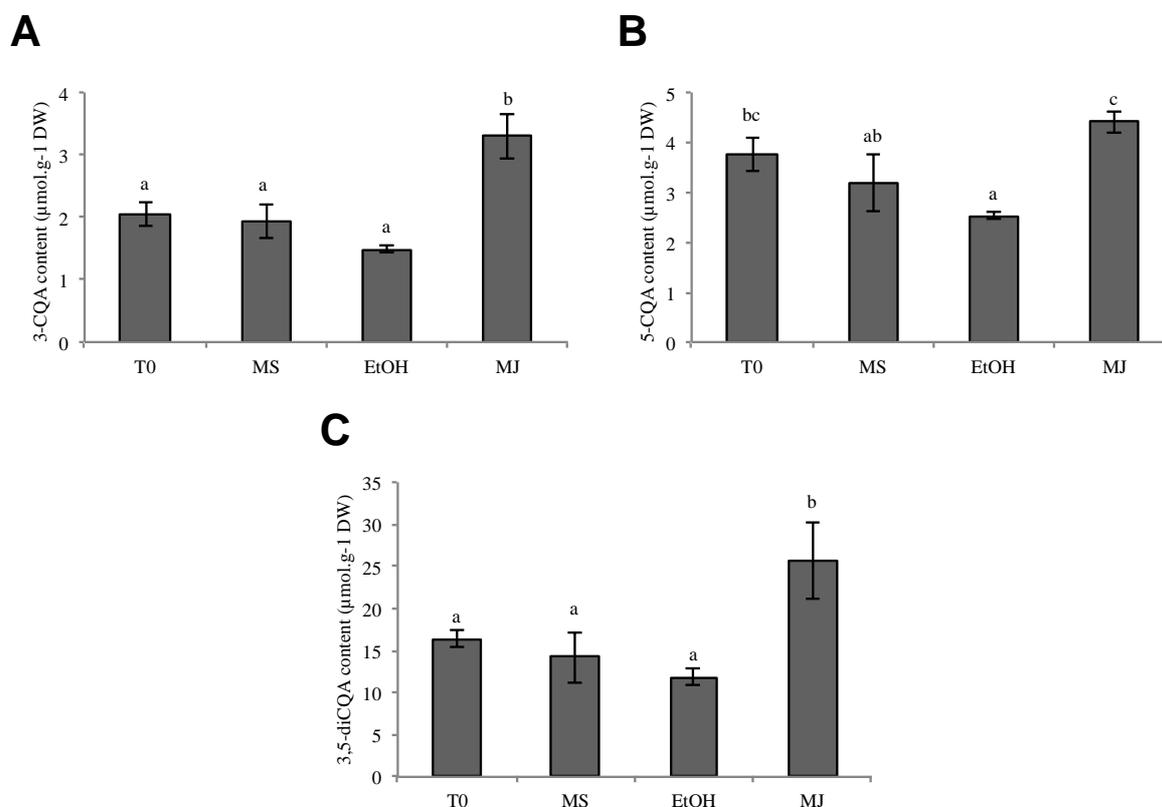


Figure 4. Contents of 3-CQA, 5-CQA and 3,5-diCQA in chicory cell cultures under different conditions. Methanolic extracts were analysed by HPLC. MJ: cell cultures treated with 50 μM MeJA for 24 h, MS: cultures kept on MS medium for 24 h, EtOH: cell cultures treated with ethanol for 24 h. Values are means of three replicates \pm SD. Different letters in the same histogram indicate significant differences ($P < 0.05$).

Figure 5. Phylogenetic analysis and sequence comparison of the five members of the BAHD family identified in this study.

A: Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of HCTs and HQTs from chicory and biochemically characterized members of BAHD family members. Only the clade Vb is represented. The phenogram was generated by the neighbor-joining method following alignment by the clustalW algorithm using MEGA software (bootstrap method, 2000 replications). B: Amino acid sequence comparison of chicory HCTs and HQTs. Black bars indicate the conserved BAHD acyltransferase domains (HXXXDG and DFGXG). The intron "Q" when present is located between the Q and V residue of the predicted aminoacid sequence (black frame). CcaHCT: HCT from *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (AFL93686), CiHCT1: this work (KT222891), CiHCT2: this work (KT222892), NtHCT: HCT from *Nicotiana tabacum* (CAD47830), CcHCT: HCT from *Coffea canephora* (CAJ40778), TpHCT1A: HCT from *Trifolium pratense* (ACI16630), TpHCT1B: HCT from *Trifolium pratense* (ACI28534), AtHCT: HCT from *Arabidopsis thaliana* (AED95744), PrHCT: HCT from *Pinus radiata* (ABO52899), AsHHT1: hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase1 from *Avena sativa* (BAC78633), CcsHQT: HQT from *C. cardunculus* var. *scolymus* (ABK79689), CcaHQT: HQT from *C. cardunculus* var. *altilis* (ABK79690), CiHQT1: this work (KT222893), CiHQT2: this work (KT222894), CiHQT3: this work (KT222895), CcHQT: HQT from *C. canephora* (ABO77957), NtHQT: HQT from *N. tabacum* (CAE46932), SIHQT: HQT from *Solanum lycopersicum* (CAE46933), SsHCT: HCT from *Solenostemon scutellarioides* (CAK55166), LaAT1: alcohol acyltransferase 1 from *Lavandula angustifolia* (ABI48360), DcHCBT: anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyl transferase from *Dianthus caryophyllus* (CAB06430), TpHCT2: HCT from *T. pratense* (ACI16631), AtSHT: spermidine N-hydroxycinnamoyltransferase from *A. thaliana* (AEC06845), HvACT: agmatine coumaroyltransferase from *Hordeum vulgare* (AAO73071).

Figure 6, Legrand et al.

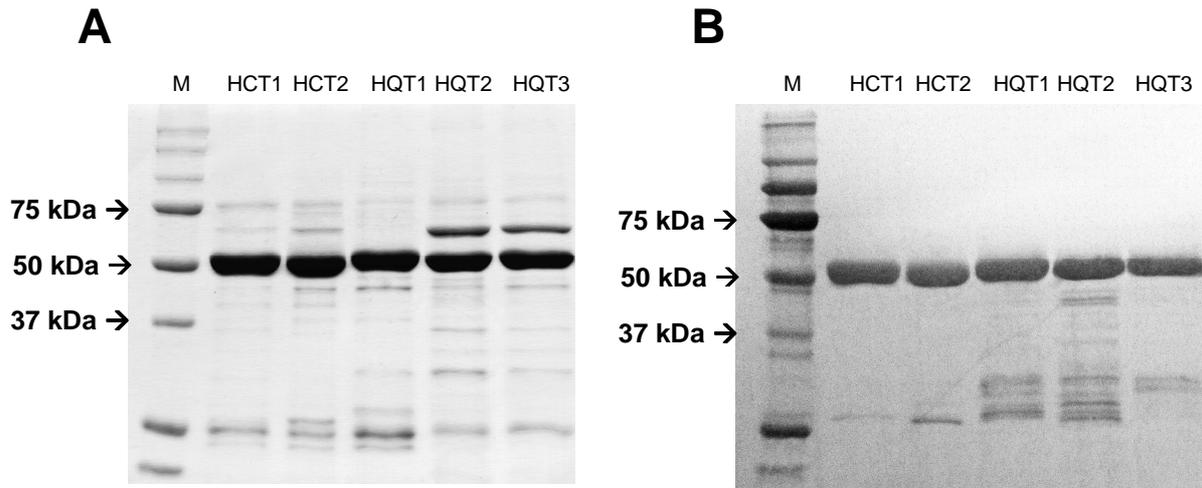


Figure 6. Expression and purification of recombinant HCT and HQT proteins. A: SDS-PAGE separation of recombinant HCT and HQT. The gel was stained with Coomassie blue. B: Immunoblot analysis confirming the expression of the recombinant proteins. The proteins were detected with anti-His antibody. M: Markers.

Fig. 7, Legrand et al.

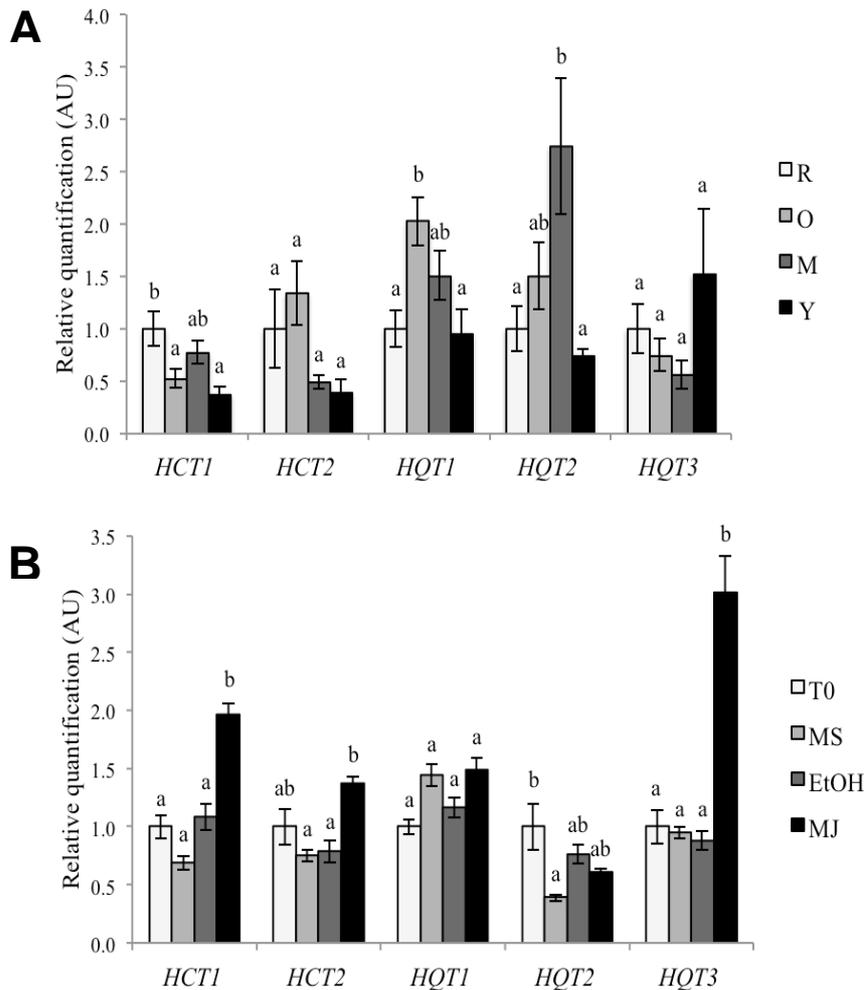


Figure 7. Expression of HCT1, HCT2, HQT1, HQT2 and HQT3 in various chicory tissues. mRNA abundance in different parts of 6-week-old seedlings (A) and culture cells elicited or not with MeJA (B) was determined by qRT-PCR. A: Expression levels were normalized to the expression of CLATH and SAND and presented relative to that of Roots. Y: young leaves, M: intermediate leaves, O: Old leaves, R: roots. B: Expression levels were normalized to the expression of TIP41 and PP2AA2 and presented relative to that of T0. T0: cells samples before elicitation, MJ: cell cultures treated with 50 μ M MeJA for 24 h, MS: cultures kept on MS medium for 24 h, EtOH: cell cultures treated with ethanol for 24 h. Error bars indicate standard errors of the mean. Different letters above histograms indicate statistical difference highlighted using ANOVA (p -value < 0.05).

Table I. Caffeic acid ester contents in leaves and roots of 6-week-old plants of chicory.

Values are means of 4 independent biological replicates \pm SD. Nd = Not detected.

	Roots		Leaves	
	$\mu\text{mol.g}^{-1}$ DW	% Total	$\mu\text{mol.g}^{-1}$ DW	% Total
Chlorogenic acid	3.7 ± 1.6	34.9	6.1 ± 1.2	20.5
Neochlorogenic acid	0.1 ± 0.0	0.9	nd	0
Isochlorogenic acid	6.7 ± 3.0	63.2	0.3 ± 0.1	1.0
Caftaric acid	nd	0	4.5 ± 0.8	15.2
Chicoric acid	0.2 ± 0.1	1.9	18.9 ± 2.2	63.6
Total	10.6 ± 4.6	100	29.7 ± 4.0	100

Table II. Competition assays to determine the preferred acyl acceptor of HCTs and HQTs. Recombinant proteins were incubated with caffeoyl-CoA or coumaroyl-CoA and both quinic and shikimic acids at the same concentrations. After 1 h, products of the reactions were quantified in μmol and the relative concentrations of each product calculated (% of total products). Values are means of 3 independent replicates.

Enzymes	competing substrates: quinate and shikimate			
	+ caffeoyl-CoA		+ coumaroyl-CoA	
	caffeoylquininate	caffeoylshikimate	coumaroylquininate	coumaroylshikimate
HCT1	0	100	0	100
HCT2	0	100	0	100
HQT1	93	7	97	3
HQT2	100	0	61	39
HQT3	92	8	92	8

Table III. Kinetic parameters of HCTs and HQTs from chicory. The Michaelis constants (K_m) were determined using various substrate concentrations (Acyl-CoA or acid). Data are summarized as the arithmetic means \pm SEs of three independent experiments.

A. HCT1 and HCT2

varying substrate	saturating substrate	HCT1			HCT2		
		$K_m \pm SD$	$V_{max} \pm SD$	V_{max}/K_m	$K_m \pm SD$	$V_{max} \pm SD$	V_{max}/K_m
		μM	$nkat.mg^{-1}$	$nkat.mg^{-1}.\mu M^{-1}$	μM	$nkat.mg^{-1}$	$nkat.mg^{-1}.\mu M^{-1}$
shikimate	caffeoyl-CoA	8.00 \pm 0.63	948 \pm 52	119	5.42 \pm 0.37	1114 \pm 48	206
caffeoyl-CoA	shikimate	277 \pm 65	62.4 \pm 5.6	0.22	25.8 \pm 3.35	26.8 \pm 1.1	1.04
shikimate	<i>p</i> -coumaroyl-CoA	0.32 \pm 0.04	144 \pm 5.7	450	0.61 \pm 0.04	226 \pm 5.8	370
<i>p</i> -coumaroyl-CoA	shikimate	244 \pm 56	89.1 \pm 8.1	0.36	187 \pm 36.9	238 \pm 20	1.27

B. HQT1, HQT2 and HQT3

varying substrate	saturating substrate	HQT1			HQT2			HQT3		
		$K_m \pm SD$	$V_{max} \pm SD$	V_{max}/K_m	$K_m \pm SD$	$V_{max} \pm SD$	V_{max}/K_m	$K_m \pm SD$	$V_{max} \pm SD$	V_{max}/K_m
		μM	$nkat.mg^{-1}$	$nkat.mg^{-1}.\mu M^{-1}$	μM	$nkat.mg^{-1}$	$nkat.mg^{-1}.\mu M^{-1}$	μM	$nkat.mg^{-1}$	$nkat.mg^{-1}.\mu M^{-1}$
quininate	caffeoyl-CoA	0.16 \pm 0.03	99.9 \pm 5.0	624	0.61 \pm 0.05	118 \pm 3.9	193	0.59 \pm 0.06	189 \pm 6.8	320
caffeoyl-CoA	quininate	132.7 \pm 28.6	112 \pm 7.3	1.18	17.8 \pm 3.71	37.4 \pm 1.4	2.10	63 \pm 8.7	88.5 \pm 4.2	1.40
quininate	<i>p</i> -coumaroyl-CoA	4.49 \pm 0.43	2097 \pm 102	467	0.64 \pm 0.07	136 \pm 5.3	213	0.41 \pm 0.23	93.5 \pm 11	228
<i>p</i> -coumaroyl-CoA	quininate	276 \pm 117	535 \pm 108	1.94	47.4 \pm 10.0	75.1 \pm 6.9	1.58	159.6 \pm 50.0	193 \pm 19	1.21

Table IV. Sequence of primers used in this study. This includes oligonucleotides used for cloning and expression analysis. CLATH: Clathrin adaptator complex subunit, TIP41: TIP41 like protein, PP2AA2: Protein Phosphatase 2A subunit A2, SAND: SAND family protein.

Primer sequence (5' to 3')		Gene	Application
CACACATGAAGATCGAGGTGAGAGA CACACTTATATATCATAAAGAACTTGCTAA	Fwd Rev	HCT1	subcloning into pGEM-T easy
CACACATGACTAACGGAGCTGGTTC CACACCAAGACTCTAAAAGTCGTACAAGT	Fwd Rev	HQT1	subcloning into pGEM-T easy
CACACATGAAGATCGCGATTAGAGAAT CCAACATTTTCAGATATCATAACAAGA	Fwd Rev	HCT2	subcloning into pGEM-T easy
CGATGAGAAGTGATCAAAAAGATG CCTTACATTTTCATACAAAAACTTCTCG	Fwd Rev	HQT2	subcloning into pGEM-T easy
CACACATGGGGAGCGATCACAAA CACACTTAAAACCTACATAAGAAGCTTCTCAA	Fwd Rev	HQT3	subcloning into pGEM-T easy
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGACTAACGGAGCTGGTTCG GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATAATCATAAAGAACTTGCTAAAAACC	Fwd Rev	HQT1	cloning into pDEST17
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAAGATCGAGGTGAGAGAATC GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATAATCATAAAGAACTTGCTAAAAACC	Fwd Rev	HCT1	cloning into pDEST17
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAAGATCGCGATTAGAGAATC GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGATATCATAACAAGAAGCTTCTCAA	Fwd Rev	HCT2	cloning into pDEST17
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAGAAGTGATCAAAAAGATGATGAT GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTACATTTTCATACAAAAACTTCTCGAA	Fwd Rev	HQT2	cloning into pDEST17
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGGAGCGATCACAAA GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAAACCTACATAAGAAGCTTCTCAA	Fwd Rev	HQT3	cloning into pDEST17
TTGCAGGTGAGCTAATGTCG CGAACCCAGAGCCTTCAAATC	Fwd Rev	HCT1	qRT-PCR
TGGGCTAGGCTTCTTATCA AAATGGCAATCCACAAGCTC	Fwd Rev	HCT2	qRT-PCR
CCCCACCATCACTAATCACC CGGCTATGATCACGAATGTG	Fwd Rev	HQT1	qRT-PCR
TTGGAGTCGAAAAGGATCT GCCATATCCGAAATCAGCAT	Fwd Rev	HQT2	qRT-PCR
CGACTCAACCGCTTTCAAAT ACTCGGACCACGAATCAAAG	Fwd Rev	HQT3	qRT-PCR
TGCTTCCGCCATCTACTTTT TCCCAAGTTCTTTGTTTGC	Fwd Rev	CLATH	qRT-PCR
GTTGGGTGCGCATCTCTAAT AGCTCCGGCAGCTTTTACTT	Fwd Rev	TIP41	qRT-PCR
CATGGGCTCAGAAATCACCT ATTGGTCAACGATGGGGATA	Fwd Rev	PP2AA2	qRT-PCR
TGCTTACACCACAAGGCAAG GAAGCAGCATGTCATCAGGA	Fwd Rev	SAND	qRT-PCR

Résultats complémentaires

1 Matériel et méthodes

1.1 Mesure du pH optimal pour les activités CiHCT1 et CiHQT1

Pour le calcul du pH optimal réactionnel pour les activités CiHCT1 et CiHQT1, des tests enzymatiques sont réalisés en présence de différents tampons : tampon acétate (pH 4 ; 4,6 ; 5) et tampon phosphate (pH 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8). 150 µg d'enzymes sont mises en présence de 50 µM de caféoyl-CoA et 5 mM de shikimate ou de quinate, pour CiHCT1 et CiHQT1 respectivement. Après 5 min de réaction, la réaction est arrêtée avec l'ajout de 10 µL de solution d'acide formique 10%. 50 µL sont prélevés et filtrés (0,45 µm). Le filtrat est stocké à -20 °C en attente de l'analyse des composés phénoliques par CLHP-UV.

1.2 Transformation d'*Arabidopsis thaliana*

1.2.1 Transformation des *Agrobacterium tumefaciens* par électroporation

Des *Agrobacterium tumefaciens* sont transformées par électroporation d'une part avec une construction pB2GW7 + CiHCT1 et d'autre part avec pB2GW7 + CiHQT1 (vecteur pB2GW7, Plant Systems Biology – Université de Gand, Belgique) (figure 2.2). Dans ce vecteur, les gènes sont sous contrôle du promoteur 35S, qui est un promoteur fort et constitutif. Ce vecteur présente également deux gènes de résistance utilisés comme marqueurs de sélection chez les bactéries (résistance à la spectinomycine ou à la streptomycine) et chez les plantes (résistance au glufosinate - basta®).

Pour cela, 1 µL de plasmides sont ajoutés à 40 µL de bactéries compétentes. L'ensemble, bien homogénéisé, subit ensuite un choc électrique permettant l'entrée des plasmides dans les bactéries. 950 µL de milieu YEB liquide est ensuite ajouté dans la cuve. Puis, l'ensemble est transféré en tube et incubé durant 2h30 à 28 °C sous une agitation de 200 rpm. Enfin, les *Agrobacterium* sont étalées sur boîtes de Petri contenant du milieu YEB additionné de 100 µg.mL⁻¹ de rifampicine, 50 µg.mL⁻¹ de gentamicine et de 100 µg.mL⁻¹ de spectinomycine. Les boîtes sont placées à 28 °C jusqu'à ce que les colonies se développent. Quelques colonies sont ensuite sélectionnées, repiquées et servent de matériel pour la suite des expérimentations. La présence de notre gène d'intérêt est vérifiée par PCR.

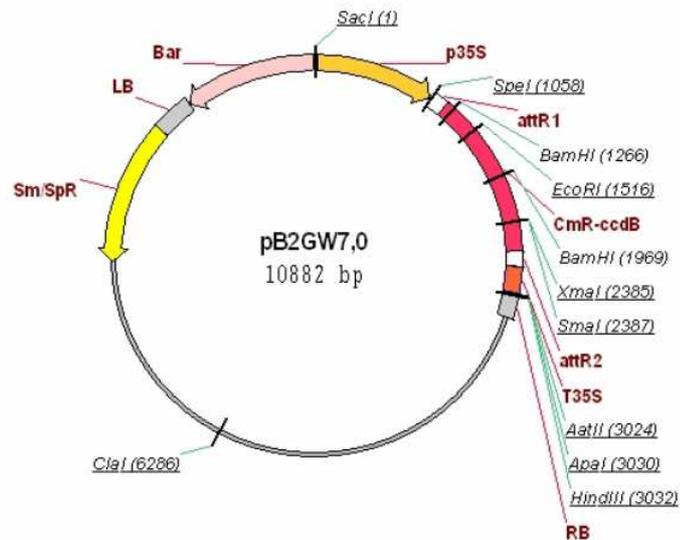


Figure 2.2 : Carte du vecteur de transformation pB2GW7. (thèse A. Taylor, 2009)

1.2.2 Floral dip

Quatre pré-cultures à partir de 4 souches d'*Agrobacterium* sélectionnées sont initiées dans 5 mL de milieu YEB additionné de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicine, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicine et de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de spectinomycine. Celles-ci sont placées en agitation (130 rpm) à 28 °C pendant 24h. S'ensuit une culture en gros volume : les 4 pré-cultures sont mélangées et versées dans 150 mL de milieu YEB additionné de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rifampicine, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicine et de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de spectinomycine. Les cultures sont mises à agiter à 150 rpm, à 28 °C jusqu'à ce que la DO à 600 nm soit entre 1,5 et 2. Les cultures sont centrifugées pendant 10 min à 5000xg et à 18 °C. Le culot est récupéré dans 250 mL de sucrose 5 % autoclavé. A l'ensemble est ajouté 50 μL de silwet L-77. Les hampes florales d'*A. thaliana* Col-0 âgées de 7 semaines sont plongées durant 30 s dans cette solution d'*Agrobacterium* puis délicatement séchées sur papier filtre. Les graines des plantes transformées sont ensuite récoltées environ 5 semaines après transformation (Clough et Bent, 1998).

1.2.3 Sélection des lignées homozygotes simple insertion

Les graines des plantes transformées (génération T0) sont ensuite semées et subissent après 1 semaine de culture, 3 traitements successifs (espacés de 5 jours) au basta (60 mg.L^{-1} de glufosinate et tween 20, 200 $\mu\text{L.L}^{-1}$, ajouté juste avant le traitement). Les plantes résistantes produisent alors des

graines, ce qui constitue la génération T1. Les graines T1 sont mises à germer sur boîte de Petri contenant un milieu de culture MS 0,5 x additionnée d'AGAR 0,8 % et de basta 10 mg.L⁻¹ (16/8 h, 25/20 °C). Les graines subissent au préalable une stérilisation sous cloche avec un mélange constitué de 50 mL de javel (9,6 % de chlore actif) et de 3 mL d'HCl à 37 % pendant 2 h. Une fois semées en boîte de Petri, elles subissent également une étape de vernalisation à 4 °C, à l'obscurité pendant 48h. Les lignées simple insertion sont sélectionnées après comptage sur boîte de Petri des plantules germées et des plantules au développement avorté. Un ratio de 75 % de plantules vivantes sur 25 % de plantules mortes atteste d'une insertion simple de l'insert dans le matériel génomique de la plante.

Les plantules des lignées sélectionnées sont ensuite repiquées et cultivées en serre (22 °C avec un cycle jour/nuit de 16/8 h) et les graines de nouveau récoltées (génération T2). Cette fois-ci les lignées 100 % résistantes au traitement au basta seront repérées et utilisées pour la suite des études. Ces lignées sont considérées comme homozygotes et possédant une insertion simple du transgène, CiHCT1 ou CiHQT1, qu'elles sur-exprimeront grâce au promoteur 35S.

1.2.4 Analyses génotypiques et expression des gènes

L'ADN génomique a été extrait à partir de feuilles issues des plantes homozygotes pour les gènes d'intérêt, âgées de 4 semaines, en utilisant le kit d'extraction Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel)

A partir de ce matériel génétique, des PCRs ont été entreprises afin de vérifier l'insertion des transgènes. Plusieurs couples d'amorces spécifiques des gènes CiHCT1 et CiHQT1 ont été utilisés ainsi qu'une amorce spécifique du promoteur 35S (figure 2.3).

La réaction est réalisée dans un volume de 15 µL composé de 0,25 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, tampon 10x, 10 ng.mL⁻¹ de BSA et de 0,025 U.µL⁻¹ de Taq applied Biosystem avec 1 µL d'ADN et 2 µL d'un mélange d'amorces sens et antisens (5 mM).

Les ARNs totaux ont été isolés à partir de rosettes en utilisant le kit Nucleospin RNA (Macherey-Nagel). Les ARNs sont ensuite analysés sur gel d'agarose (1,5 %) avec mise en évidence des bandes par le gel RED (5 µL pour 100 mL de gel).

séquence (5' - 3')		gène
TTCAATGTCCCTGCCATGTA	fwd	AtACT2
TGAACAATCGATGGACCTGA	rev	AtACT2
CGCACAAATCCCCTATCCTT	fwd	P35S
GTTGTCCCGAATTTCCACAC	fwd	HCT1
AAATCATCGACCATGCCATC	rev	HCT1
TGGTGGGGTTTCACTAGGAG	fwd	HCT1
GTTGTTTCGTGGGTGGATTTT	rev	HCT1
AGGAAAACGGCAACACAATC	fwd	HCT1
CGACATTAGCTCACCTGCAA	rev	HCT1
AGCTGAAGCGGATTGTAGGA	fwd	HQT1
ATCGGACCATGTGTTGATGA	rev	HQT1
TTCGGGAAAATGAAGGTGAC	fwd	HQT1
CTCTGCCATCCCCATCTTTA	rev	HQT1
TACATGAGATCGGCCATTGA	fwd	HQT1
AGTCTAAGCACACCGCAA	rev	HQT1

Figure 2.3 : Séquences des amorces utilisées pour la vérification de l'insertion des gènes d'intérêt CiHCT1 et CiHQT1 chez *A.thaliana*

1.2.5 Analyses phénotypiques

Les rosettes de 4 plantes homozygotes pour les transgènes, âgées de 4 semaines, sont prélevées pour chaque lignée. Le matériel est ensuite stabilisé par immersion dans l'azote liquide puis conservé à -80 °C. Les échantillons sont lyophilisés par la suite pendant 48 h et broyés dans un mortier avec du solvant d'extraction des polyphénols méthanol / eau ultra-pure / acide acétique (75/23/2, v/v/v) avec un ratio 1 mL d'extractant pour 100 mg de matière sèche. La suspension est mise en agitation pendant 12h à l'obscurité et à température ambiante. Les tubes sont centrifugés à 14000xg pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants sont ensuite filtrés sur plaques (Whatman, 0,45 µm, PVDF). Les filtrats sont récupérés et déposés sur une plaque d'analyse HPLC. La méthode d'analyse de la composition en polyphénols a été présentée dans le chapitre 1 (§3.3, méthode 2 – p 121).

Des fragments de hampes florales sont prélevés pour chaque lignée. Celles-ci sont conservées à 4 °C dans une solution éthanol à 70 %. Des coupes transversales fines sont effectuées puis immergées quelques secondes dans une solution de phloroglucinol (2 %). Le montage a été effectué sur lame dans une goutte d'HCl 6 N, permettant ainsi la révélation et l'observation des tissus lignifiés par microscopie photonique (10x) et à la loupe binoculaire. La lignine est ainsi colorée en rouge.

1.3 Agroinfiltration de tabac

Des *Agrobacterium* transformées avec les constructions 35S-CiCHCT1 et 35S-CiHQT1 sont inoculées dans 20 mL de milieu YEB additionné de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de rifampicine, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de gentamicine et de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de spectinomycine. A une densité optique comprise entre 0,8 et 1 (600 nm), les cultures sont centrifugées à 5000xg pendant 15 min. Les culots sont repris dans un tampon d'activation (10 mM de MES / KOH pH 5,6 ; 10 mM de MgCl_2 ; 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ acétosyringone – ajouté juste avant resolubilisation des culots). Le volume de tampon est ajusté de façon à atteindre une DO de 1. Les solutions sont incubées à température ambiante pendant 3 h. L'infiltration est ensuite réalisée à la seringue sur des plants de tabac âgés de 6 semaines cultivés en serre (22 °C avec un cycle jour/nuit de 16/8 h) (figure 2.4). Quatre plantes sont utilisées pour chaque construction, 2 feuilles par plantes infiltrées sont rassemblées et constituent une répétition. Le témoin est réalisé en injectant du tampon d'activation simple dans le limbe de feuilles de tabac. Le protocole d'extraction et de quantification des composés phénoliques est le même que dans le cas des *Arabidopsis* transformées (§1.2.5 de ce même chapitre – p 223).



Figure 2.4 : Agroinfiltration de feuilles de tabac (photographie : D. Gagneul)

2 pH réactionnel optimal de CiHCT1 et CiHQT1

Le pH réactionnel a été estimé pour chaque type d'enzymes (HCT et HQT) au travers de tests enzymatiques réalisés avec CiHCT1 et CiHQT1. Deux tampons ont été utilisés pour couvrir une gamme de pH allant de 4 à 8 : les tampons acétate et phosphate. La production de caféoylshikimate en présence de caféoyl-CoA et de shikimate a été quantifiée dans le cas de CiHCT1 et celle de caféoylquininate en présence de caféoyl-CoA et de quinate pour CiHQT1 (figure 2.5).

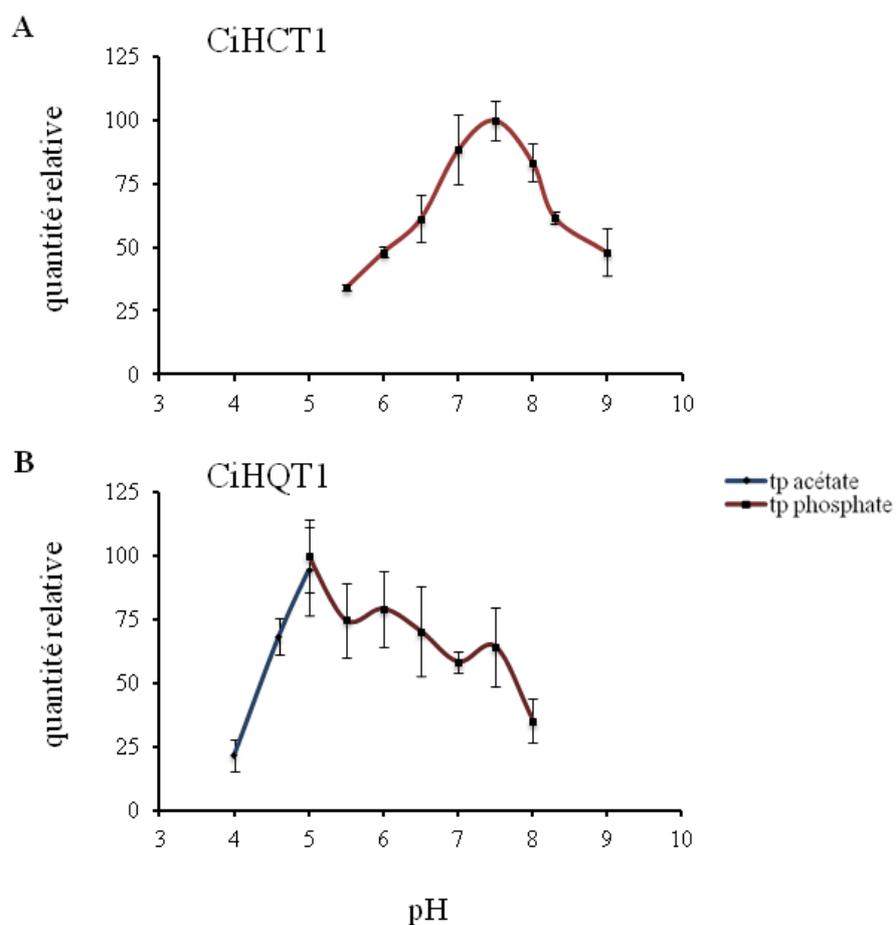


Figure 2.5 : Détermination du pH réactionnel optimal pour CiHCT1 (A) et CiHQT1 (B).
Quantifications par HPLC-UV de caféoylshikimate pour CiHCT1 et caféoylquininate pour CiHQT1

A la lecture des résultats, le pH optimal permettant une pleine activité de la CiHCT1 est de 7,5 alors qu'il est de 5 pour CiHQT1. Néanmoins, pour cette dernière, la courbe de pH est un peu moins caractéristique de ce que l'on observe habituellement. En effet, la diminution de l'activité de

l'enzyme à partir du pH 5 et vers des pH plus basiques est moins nette et beaucoup plus progressive. Ce profil pourrait être caractéristique des HQTs. En effet, un résultat du même type est retrouvé dans les travaux de Moglia pour une HQT de tomate (Moglia *et al.*, 2014).

3 Introduction de CiHCT1 et CiHQT1 dans des systèmes hétérologues

Les gènes CiHCT1 et CiHQT1 ont chacun été introduits chez *A. thaliana* et soumis sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort, le promoteur 35S. Des difficultés ont été rencontrées pour les analyses génétiques et transcriptionnelles de ces lignées. Cela est probablement dû aux fortes homologies de séquences nucléotidiques codant les protéines de la famille des BAHD, que cela soit intra-espèces ou inter-espèces (D'Auria *et al.*, 2006).

Des analyses métaboliques par comparaison des lignées sauvages et transformées ont été, malgré tout, effectuées afin d'identifier d'éventuels changements induits par l'introduction des transgènes. Les profils HPLC obtenus à 320 nm ont permis de mettre en évidence, dans un premier temps, 7 pics majoritaires au sein des échantillons d'Arabette analysés (figure 2.6 et 2.7).

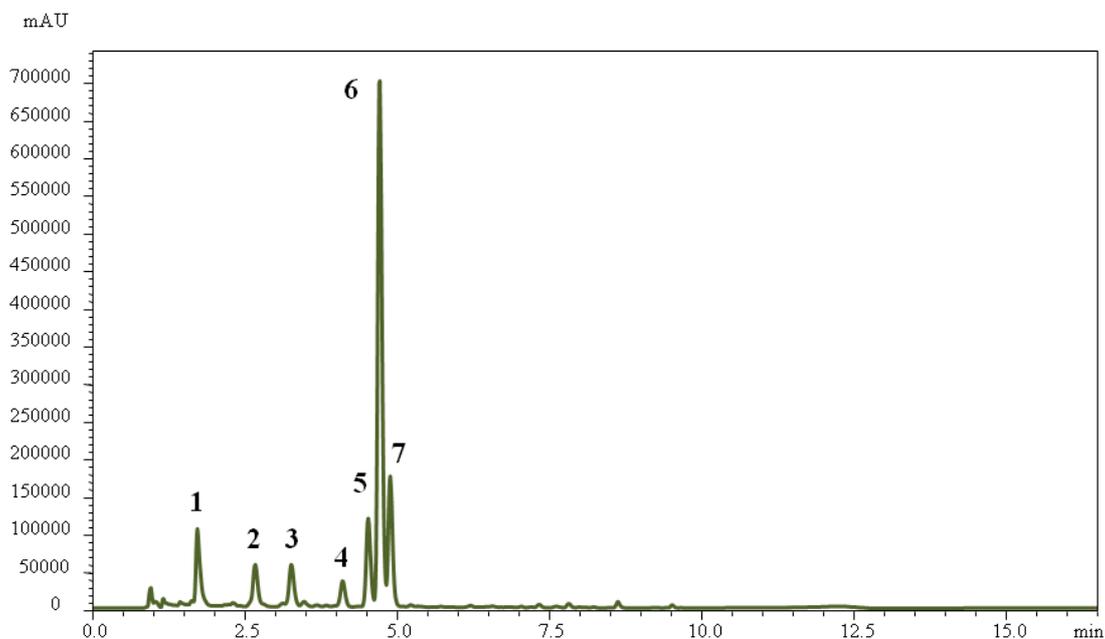


Figure 2.6 : Chromatogramme d'extrait méthanolique de feuilles d'*Arabidopsis* transformée avec le transgène CiHCT1 et ciblage des pics majoritaires.

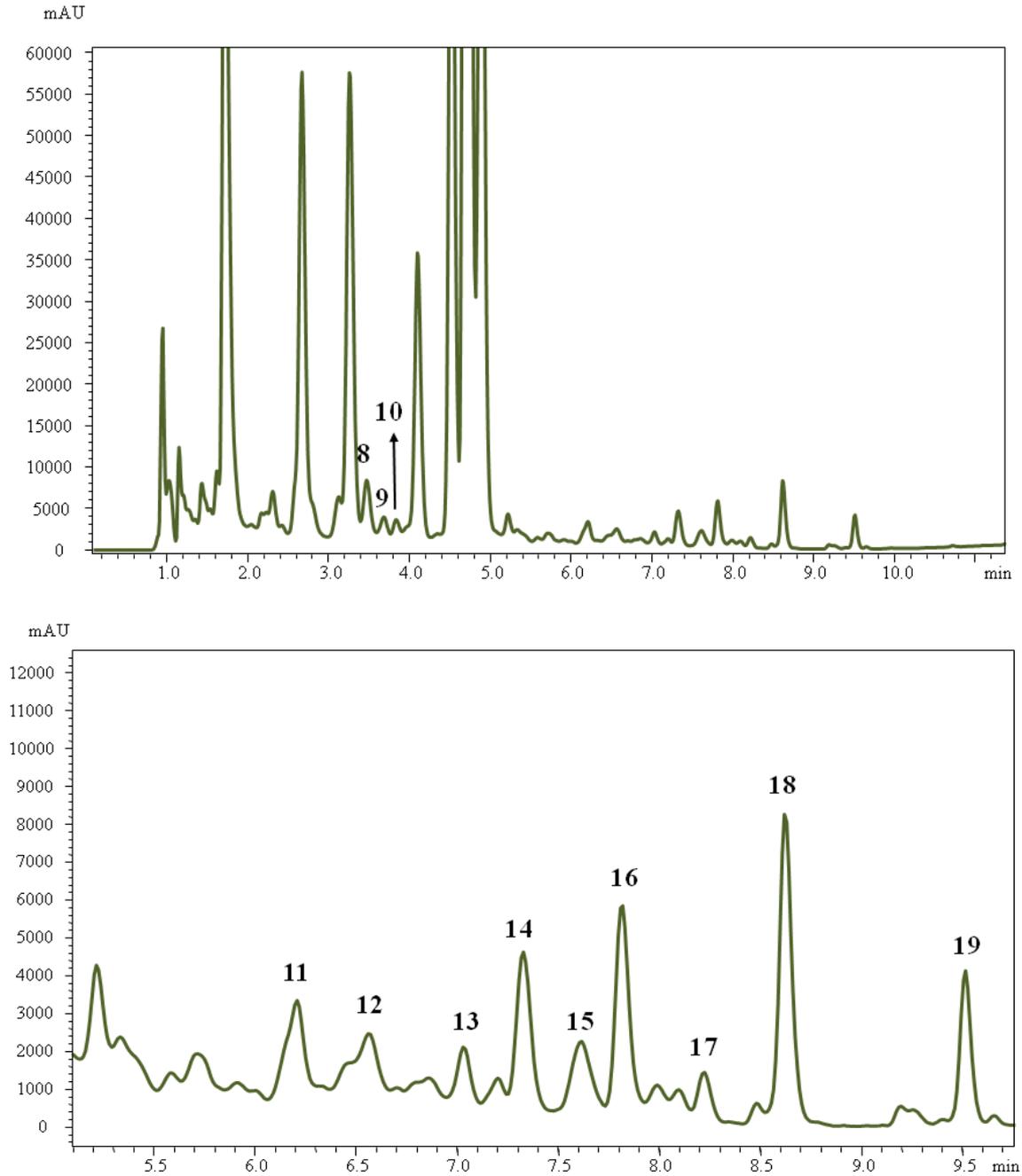


Figure 2.7 : Chromatogrammes d'extrait méthanolique de feuilles d'*Arabidopsis* transformée avec le transgène CiHCT1 et ciblage des pics minoritaires.

Aucune lignée n'a montré de différence significative concernant les quantifications de ces pics par rapport à des lignées témoins Col-0. La teneur en CQA, en particulier, ne semble pas être affectée par cette manipulation génétique. Dans un deuxième temps, les pics minoritaires ont été ciblés (12 pics supplémentaires). Les conclusions sont similaires.

Les gènes manipulés entrent en jeu dans la synthèse de composés impliqués dans la voie de biosynthèse de la lignine. Des coupes transversales à la base des hampes florales ont alors été réalisées chez chacune des lignées étudiées dans le but de visualiser d'éventuelles modifications tissulaires induites par la transformation. Une méthode de coloration de type phloroglucinol-HCl a été utilisée. Néanmoins, l'observation des coupes à la loupe binoculaire a montré qu'il n'existait pas de différence marquante entre les lignées Col-0 et les lignées transformées.

De la même façon, les manipulations d'agroinfiltration de tabac n'ont pas donné de résultats significatifs. En effet, aucune différence dans les teneurs en polyphénols entre les feuilles infiltrées et les feuilles témoins n'a été constatée.

Discussion et perspectives

Afin d'explorer la voie de biosynthèse des acides hydroxycinnamiques chez la chicorée, 5 gènes (2 HCTs et 3 HQTs) de la famille des BAHD ont été identifiés par comparaison avec des séquences connues chez d'autres espèces. Ces 5 candidats ont été caractérisés d'un point de vue moléculaire et biochimique. Cette étude nous a permis également de montrer qu'une HQT et les deux HCTs seraient impliquées particulièrement dans la production de CQA orientée vers l'accumulation de ce composé. En effet, l'expression des gènes codant ces enzymes est accrue dans des conditions d'accumulation particulière du CQA. Ces résultats constituent une première contribution à la compréhension des bases génétiques de la biosynthèse des acides hydroxycinnamiques chez la chicorée. Nous avons pu apporter des résultats confirmant la spécificité de la famille des *Asteraceae* concernant les hydroxycinnamoyltransférases de la famille des BAHD. En effet, il semblerait que les plantes de cette famille aient comme caractéristique de posséder plusieurs copies de HCT et de HQT. Trois HQTs et une HCT ont été décrites chez l'artichaut. Plusieurs membres de ces types d'enzymes ont également été décelés chez le tournesol et la laitue (Sonnante *et al.*, 2010). Nous avons pu voir à travers ces travaux l'existence de spécificités des rôles de ces protéines. Malgré cela, les raisons de ces multiples copies ne peuvent pas encore être totalement expliquées.

Pour déterminer les rôles physiologiques respectifs de CiHCT1 et CiHQT1, dans un premier temps, ces deux gènes codant ces enzymes ont été introduits chez *Arabidopsis*, une espèce ne possédant pas HQT et accumulant peu de CQA. De nombreuses questions pouvaient, en effet, être émises : est-ce qu'une espèce non accumulatrice de CQA pourrait le devenir *via* l'introduction du gène HQT ? Quels en sont les effets chez une plante non accumulatrice naturellement ? La sur-expression de HCT et HQT aboutit-elle à des résultats phénotypiques similaires ?

Malheureusement, ces premières manipulations n'ont pas été fructueuses et nécessitent de s'y pencher plus longuement. Nous avons privilégié CiHQT1, nous pourrions éventuellement envisager ce travail avec CiHQT3 puisque il a été montré qu'elle serait particulièrement impliquée dans l'accumulation de CQA (Legrand *et al.* – soumis). Cependant, depuis ces travaux, un protocole de transformation permettant l'expression d'un gène chez la chicorée a été travaillé. Le transfert d'une méthode d'agroinfiltration sur tabac chez la chicorée a pu être réalisé. Des résultats encourageants ont pu être émis (rapport M2 - 2015 - Cyril Raveschot). En ce qui concerne les analyses de lignine dans des coupes de hampes florales, il est important de préciser que les hampes ont été prélevées à un stade tardif de développement de manière à pouvoir visualiser les régions interfasciculaires

lignifiées. D'autres profils auraient pu être observés à différentes hauteurs de hampe et à des âges différents.

Néanmoins, 5 enzymes ont pu être caractérisées et reconnus comme impliquées dans la synthèse des acides hydroxycinnamiques et notamment des acides chlorogéniques. Leur rôle potentiel dans la synthèse de l'acide isochlorogénique, composé final dans la voie de biosynthèse des acides chlorogénique, a porté pour la suite notre attention.

Chapitre 3

**Vers l'identification de l'enzyme responsable de
la conversion d'acide chlorogénique en acide
isochlorogénique chez la patate douce**

Introduction

La chicorée possède un panel de polyphénols dont la co-accumulation en fait une originalité. Comme cela a été présenté en introduction, les composés phénoliques sont des molécules antioxydantes que l'on retrouve fréquemment dans l'alimentation. Parmi ceux-ci, les acides caféoylquiniques (AmonoCQ) ainsi que les acides dicaféoylquiniques (AdiCQ) et tricaféoylquiniques (AtriCQ) sont notamment importants pour la santé (Clifford, 1999 ; Niggeweg *et al.*, 2004). Les AmonoCQ limitent l'oxydation des lipoprotéines à basse densité (LDL) (Meyer *et al.*, 1998). Ces modifications oxydatives sont nocives car elles sont impliquées dans la formation de plaques d'athérosclérose, une des principales causes de problèmes cardiaques (Steinberg, 1988). Les AdiCQ possèdent une activité anti-hépatotoxique (Choi *et al.*, 2005) et les AtriCQ, quant à eux, réduisent les taux de sucres dans le sang. Cette dernière constatation a été montrée chez des rats diabétiques (Islam, 2006). Un effet protecteur contre diverses maladies pour l'Homme des AdiCQ a pu également être mis en évidence. En outre, ils permettent de limiter efficacement la mélanogénèse, qui contribue à l'apparition de maladies neurodégénératives par la formation excessive de neuromélanine (Kaul et Khanduja, 1998 ; Lee *et al.*, 2010). Ces molécules montrent également une activité anti-inflammatoire *in vitro* (Peluso *et al.*, 1995) et possèdent un intérêt potentiel pour alléger les doses médicamenteuses dans le cadre de trithérapies pour soigner le SIDA (McDougall *et al.*, 1998 ; Robinson, 1998). Dans ce cas, les AdiCQ joueraient un rôle d'inhibiteurs de l'activité de l'intégrase HIV, qui catalyse l'insertion de l'ADN viral dans le génome des cellules hôtes (McDougall *et al.*, 1998 ; Slanina *et al.*, 2001 ; Gu *et al.*, 2007). Les effets des dérivés d'acides caféoylquiniques avec plusieurs groupes caféyles sont généralement plus forts que ceux des acides mono-caféoylquiniques. Cela est probablement dû à l'existence d'un lien entre l'activité antioxydante et le nombre de groupes hydroxyles présents sur le noyau aromatique des molécules (Wang *et al.*, 2003 ; Islam, 2006).

Différents isomères d'AdiCQ ont été identifiés dans plusieurs espèces telles que le caféier, l'artichaut, la tomate, la laitue, la chicorée et la patate douce (Clifford, 1999 ; Islam, 2006 ; Heimler *et al.* 2007 ; Moco *et al.*, 2006 ; Moco *et al.*, 2007 ; Moglia *et al.*, 2008). A ce jour, leur biosynthèse n'est pas encore complètement élucidée : dérivent-ils directement des AmonoCQ (tels que l'acide chlorogénique - CQA) *via* une seconde réaction d'acyltransférase impliquant un acyl-CoA ? La similarité structurale de ces composés suggère un lien proche entre AmonoCQ et AdiCQ sur le plan biochimique. Récemment, la synthèse d'acide isochlorogénique (acide 3,5-dicaféoylquinique - diCQA) chez le caféier a été attribuée à l'activité d'une HCT à partir de CQA et de CoA (Lallemand *et al.*,

2012). Cette enzyme capable de synthétiser ce constituant important des grains de café immatures, requiert cependant des temps de réaction relativement longs ainsi que des concentrations en substrats élevées. Cela ne reflète probablement pas la réalité *in vivo*. HCT pourrait cependant contribuer à la génération de taux élevés en diesters dans les grains de café en présence de fortes concentrations en CQA lors de la maturation des grains. Cette aptitude est également facilitée par la bonne plasticité du site actif de cette enzyme. En effet, la structure tertiaire de l'enzyme montre une poche d'affinité de taille importante pour les substrats. Cette enzyme est ainsi capable d'utiliser un grand nombre de substrats tels que le caféoyl-CoA, le coumaroyl-CoA et le féruloyl-CoA (Lallemand *et al.*, 2012). Cette activité de production de diCQA pourrait aussi être spécifique à certaines espèces, telles que le caféier. Par exemple, aucune production de ce type n'a été détectée avec l'HCT d'artichaut (Menin *et al.*, 2010).

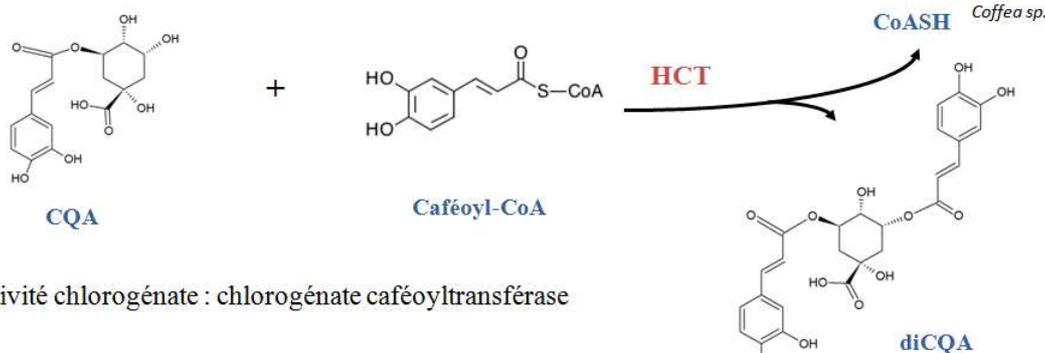
Chez la tomate, une activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransferase conduisant à la synthèse d'AdiCQ (1,5-diCQA, 3,5-diCQA et 4,5-diCQA) a été identifiée dans les fruits (Moglia *et al.*, 2014). Cette synthèse serait catalysée par une HQT, enzyme produisant du CQA et de l'AdiCQ. Son activité vers la synthèse de CQA serait privilégiée dans le cytosol et celle vers la synthèse d'AdiCQ dans la vacuole (Moglia *et al.*, 2014). Pour la production d'AdiCQ, cette enzyme transfère un groupement caféoyl d'un CQA vers un autre. Cependant, elle présente encore une fois une affinité relativement faible pour ce substrat ($K_m = 16 \text{ mM}$).

Chez la patate douce, une enzyme qui catalyse le transfert d'un groupement caféoyl d'un CQA vers une autre molécule de CQA, menant à la synthèse de diCQA a été décrite, sans identifier le gène (Villegas *et al.*, 1987). Celle-ci est dotée d'une activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase mais semble différente des HCT/HQT. Son poids moléculaire est de l'ordre de 25 kDa, alors que les acyltransférases ont généralement un poids qui avoisine plutôt les 50 kDa. Le pH optimal pour sa réaction est 5, elle ne nécessite pas l'intervention de co-facteurs et présente une stricte affinité pour le CQA, son substrat ($K_m = 0,87 \text{ mM}$). L'enzyme purifiée par Villegas et son équipe ne présente aucune affinité pour l'acide *t*-cinnamoylquinique ou encore l'acide *p*-coumarique (Villegas *et al.*, 1987).

Ainsi, deux mécanismes biosynthétiques semblent possibles (figure 3.1). Une première résulte de la production d'AdiCQ, catalysée par HCT, à partir d'AmonoCQ et d'esters de CoA. Une deuxième se traduit par le transfert d'un groupement caféoyl, d'un AmonoCQ vers un autre. Comme dit précédemment, une HQT de tomate possède une telle fonction (Moglia *et al.*, 2014). Malgré tout, une autre enzyme semble entrer en jeu dans ce système catalytique, comme cela a été montré chez la patate douce (Villegas *et al.*, 1987).

Synthèse des AdicQ (cas du diCQA à partir de CQA)

1. Activité caféoyl-CoA : chlorogénate caféoyltransférase



2. Activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase

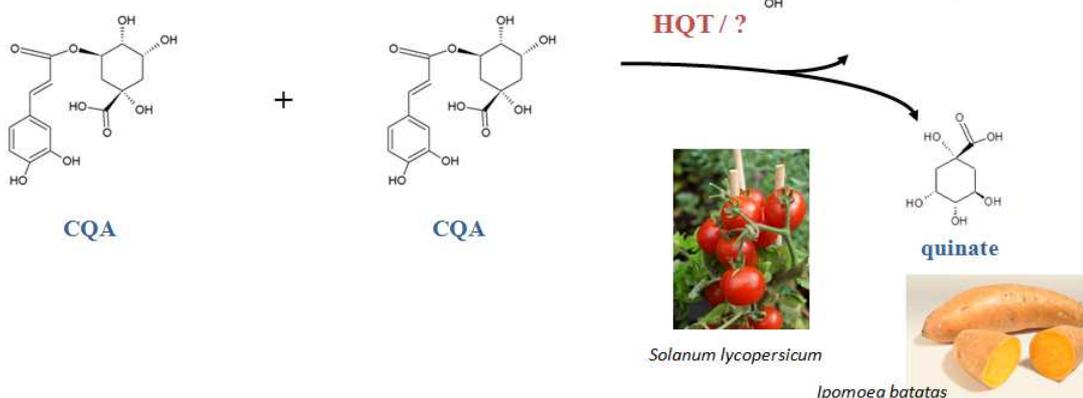


Figure 3.1 : Réactions enzymatiques conduisant à la synthèse d'AdicQ (ici le diCQA). La réaction n°1 a été mise en évidence chez le caféier et implique une HCT (Lallemand *et al.*, 2012). La réaction n°2 a été décrite chez la tomate (intervention d'une HQT, Moglia *et al.*, 2014) et chez la patate douce (enzyme caractérisée mais gène non identifié, Villegas *et al.*, 1987).

La chicorée produit et accumule du CQA et du diCQA. Leur synthèse pourrait impliquer les HCT et/ou HQT décrites dans le chapitre 2, d'une façon similaire aux résultats obtenus chez le caféier et la tomate. D'un autre côté, ce système enzymatique peut faire entrer en jeu une nouvelle enzyme, encore non caractérisée, comme c'est probablement le cas chez la patate douce. Dans ce 3^{ème} chapitre, il sera, dans un premier temps, jugé de l'implication des HCT et HQT dans la synthèse du diCQA chez la chicorée. Dans un deuxième temps, des investigations de la voie catalytique alternative impliquant l'existence d'une nouvelle enzyme seront menées chez la patate douce, dans la continuité des travaux de Villegas et son équipe. Cette enzyme sera dans la suite du manuscrit appelé ICS pour isochlorogénate synthase.

Matériel et méthodes

1 Tests enzymatiques à partir des HCT et HQT recombinantes de chicorée

Le protocole de production des HCT et HQT recombinantes est présenté dans le chapitre 2. Pour détecter l'activité caféoyl-CoA : chlorogénate caféoyltransférase de ces enzymes, 500 ng de protéines (150 ng pour CiHCT2) ont été incubées toute la nuit à 25 °C en présence de 2 mM de CQA et 2 mM de CoASH. Le mélange est équimolaire selon les modalités décrites par Lallemand (Lallemand *et al.*, 2012). Le tampon réactionnel utilisé est un tampon phosphate 100 mM de pH 7,2 ou 6.

Pour détecter l'activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase, 500 ng d'enzymes sont mises en présence de 2 mM de CQA toute une nuit à 25 °C. Le tampon réactionnel utilisé est un tampon phosphate 100 mM de pH 7,2 ou 6.

La méthode de détermination des métabolites présents dans le milieu à l'issue de ces tests par HPLC-UV est celle décrite dans le chapitre 1 (§ 3.3 , méthode 2 – p 121).

2 Protocole de purification de l'ICS

2.1 Matériel végétal

Des racines de patate douce (*Ipomoea batatas* Lam.) provenant du commerce sont utilisées pour le protocole de purification de l'ICS. Elles sont achetées le jour-même de l'expérimentation ou la veille et stockées en chambre froide (4 °C).

Selon un protocole similaire à celui de Villegas, des disques de tubercules de patate douce (1 cm de diamètre et 5 mm d'épaisseur) sont déposés sur du papier filtre imbibé d'eau ultrapure et incubés à 25 °C pendant 48 h pour induire l'augmentation de l'activité de notre enzyme (Villegas *et al.*, 1987).

2.2 Tests enzymatiques

Pour la réalisation des tests enzymatiques, un mélange comprenant 1 mM de CQA, 35 mM de tampon acétate (pH 5), 10 mM de $MgCl_2$ et l'échantillon enzymatique dans un volume final de 100 μL est incubé à 30 °C pendant 15 min. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans de l'eau à 100 °C pendant 10 min. Les extraits sont ensuite centrifugés à 12000xg à 4 °C pendant 3 min. 50 μL sont ensuite prélevés et filtrés (0,45 μm). Le filtrat est stocké à -20 °C en attente de l'analyse des composés phénoliques par HPLC-UV.

2.3 Détermination quantitative des composés phénoliques

La méthode de détermination par HPLC-UV est celle décrite dans le chapitre 1 (§ 1.3.3 , méthode 2 – p 121).

2.4 Détermination de la concentration en protéines des extraits

Les concentrations protéiques des extraits sont déterminées en utilisant le kit Bio-Rad Protein Assay et en faisant référence à une gamme étalon réalisée avec de la BSA (Bovine Serum Albumin).

2.5 Purification de l'ICS

La première étape consiste en la production d'une poudre acétonique à partir du matériel végétal frais. Pour ceci, 200 g de racines ayant subi l'étape d'incubation sont broyés à l'aide d'un broyeur mécanique dans un grand volume d'acétone refroidi à -20°C. La suspension est ensuite filtrée sur filtre de cellulose. Le résidu est lavé plusieurs fois avec de l'acétone refroidie. Le lavage est considéré comme satisfaisant lorsque les effluents sont clairs. Le résidu est séché pendant 45 min à température ambiante. Ceci constitue la poudre acétonique.

Les protéines de la poudre sont ensuite extraites à l'aide d'un tampon (4 mL de tampon pour 1 g de matière fraîche) constitué de 50 mM de tampon Hepes-KOH (pH 7,5), 2 mM d'EDTA, 10 mM de

MgCl₂, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 10 % de glycérol (v/v) et 10 % de PVPP (m/v). L'homogénat est filtré sur mousseline et centrifugé (12000xg, 4°C, 20 min). Le surnageant récupéré est ensuite fractionné à 40 % de saturation au sulfate d'ammonium. La solution est centrifugée à 12000xg et à 4 °C pendant 20 min. Le culot de protéines est alors repris dans un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7). Une deuxième centrifugation est réalisée pour éliminer les derniers résidus (4000xg, 5 min, 4°C).

L'extrait (10 mL) est ensuite chromatographié sur une colonne de 1 m (diamètre 2,5 cm) constituée d'une phase stationnaire de type Sephadex G50 superfine, équilibrée avec un tampon Tris-HCl 50 mM, pH7. L'élution est réalisée à l'aide de ce même tampon à un débit de 0,4 mL.min⁻¹. Des fractions de 1 mL sont récupérées. Les fractions de 1 mL présentant une activité enzymatique sont réunies et concentrées de façon à obtenir un volume final proche de 1 mL à l'aide d'une colonne vivaspin à limite d'exclusion de 10 kDa. Cet extrait est ensuite appliqué sur une colonne Sepharose DEAE fast flow (HiTrap DEAE Sepharose ff ; 7 x 25 mm). L'équilibration de la colonne est réalisée avec du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7) et l'élution des protéines est réalisée grâce à un gradient de NaCl (0 à 1 M). Le débit d'élution est de 1 mL.min⁻¹. Comme pour le passage sur Sephadex, les fractions présentant une activité ICS sont réunies et concentrées sur vivaspin. L'échantillon obtenu peut alors être déposé sur gel SDS-PAGE selon le protocole décrit par Sambrook *et al.* (1989). Après migration, le gel est lavé 2 fois pendant 10 min sous légère agitation dans des bains de triton 2% (v/v) préparé dans de l'eau ultra-pure. Le gel est ensuite découpé en fragments et ceux-ci sont utilisés par la suite pour la réalisation de tests enzymatiques en les incubant dans le milieu réactionnel décrit dans le § 2.2 de ce chapitre (p 237) pendant toute une nuit en agitation (1250 rpm) à 30 °C.

Concernant la migration sur gel IEF, elle est réalisée selon le protocole du fournisseur. La migration est divisée en 3 étapes : 1 h à 100 V, 1 h à 250 V et enfin 30 min à 500 V. La coloration du gel est effectuée de la même façon que pour les gels SDS. Les fragments de gel récupérés avant coloration pour la réalisation de tests enzymatiques sont broyés à l'aide de sable de Fontainebleau et resolubilisés dans du tampon Tris-HCl de 50 mM (pH 7).

3 Séquençage protéique

Le séquençage a été réalisé par l'équipe du Pr. Gunnar Wingsle de l'Ulmeå Plant Science Center. Les peptides pour l'analyse en spectrométrie de masse (SM) sont générés par digestion in-gel en présence de 50 mM de bicarbonate d'ammonium, 0,01 % de ProtéaseMax (Proméga) et 12 ng/µL de trypsine (Proméga) pendant 2 h à 37 °C. La méthode utilisée suit la description fournie par

Proméga avec la ProtéaseMax. La phase liquide de la digestion in-gel est ensuite acidifiée avec du TFA à 0,5 % (v/v). Les échantillons sont injectés sur une colonne C18 et élués pour la détection par SM.

Les peptides issus de la digestion sur gel sont analysés par LC-ESI-MS/MS par l'utilisation de SynaptG2 relié à un système nano LC (Waters). Ils sont séparés sur une colonne reverse C18 de 15 cm de long (BEH) avec un débit de 300 nL.min⁻¹ et un gradient réalisé sur 180 min de 0 à 50 % d'acétonitrile additionné de 0,1 % d'acide formique (v/v).

La détection des séquences a été réalisée à l'aide du logiciel DataAnalysis (PLGS, Protein Lynx Global Server). Une banque de données ESTs de patate douce a été générée à partir de données publiques, disponibles sur internet. Celle-ci a été retravaillée par le Dr Sylvain Legrand. Les ESTs ont été assemblées en uniséquences puis traduites dans les 6 cadres de lecture possibles. Les séquences ont ensuite été triées selon le résultat des différentes lectures de séquence.

1 Etude de l'implication des HCT/HQT de chicorée dans la synthèse de diCQA

Afin de caractériser la synthèse de diCQA chez la chicorée, l'implication des acyltransférases de la famille des BAHD, décrites dans le chapitre 2 (CiHCT1, CiHCT2, CiHQT1, CiHQT2 et CiHQT3) a d'abord été étudiée. Comme cela a été présenté en introduction de ce chapitre, deux modes d'action peuvent entrer en jeu : une activité BAHD acyltransférase de ces enzymes (activité caféoyl-CoA : chlorogénate caféoyltransférase : transfère le groupement caféoyle du caféoyl-CoA sur un acide chlorogénique), comme pour l'HCT de caféier (Lallemand *et al.*, 2012) ou une activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase (transfère le groupement caféoyle d'un acide chlorogénique vers un autre acide chlorogénique) comme pour l'HQT de tomate, des activités que l'on pourrait qualifier de secondaires pour ces enzymes (Moglia *et al.*, 2014).

1.1 Activité caféoyl-CoA : chlorogénate caféoyltransférase

Des tests enzymatiques ont été réalisés afin d'étudier les potentielles activités caféoyl-CoA : chlorogénate caféoyltransférase des HCTs et HQTs de chicorées. Pour cela, dans chaque cas (sauf CiHCT2 – 150 ng de protéines), 500 ng de protéines ont été incubées avec 2 mM de CQA et 2 mM de CoA. Les mélanges ont été réalisés à deux pH différents : 7,2 et 6.

L'apparition de caféoyl-CoA est bien effective dans chaque cas. Par contre, aucune production de diCQA n'est constatée, peu importe l'enzyme ciblée. La figure 3.2 présente un chromatogramme obtenu par HPLC dans le cas de tests enzymatiques avec CiHQT1. Les conditions d'expérimentation sont pourtant identiques à celles des investigations de Lallemand *et al.* (2012). En effet, nos enzymes ont été incubées en présence d'un mélange équimolaire de CQA et de CoASH. Des ratios équimolaires se traduisent chez le caféier par des quantités détectables de diCQA produit couplé à de plus faibles productions en caféoyl-CoA dans des conditions de pH avoisinant les 6 ; 6,5. Au

contraire, un ratio CoA/CQA élevé (10:1) engendre une forte production de caféoyl-CoA et une production nulle en diCQA (Lallemand *et al.*, 2012).

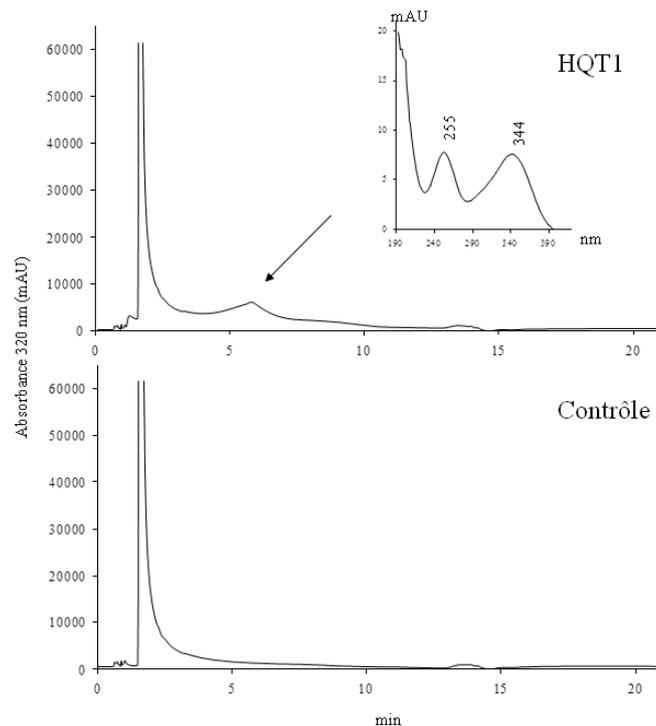


Figure 3.2 : Chromatogrammes obtenus après incubation de CiHQT1 recombinantes en présence de CQA et CoASH et spectre d'absorption du caféoyl-CoA produit.

Les réactions ont été démarrées avec 500 ng d'enzyme en présence de 2 mM de CQA et 2 mM de CoASH. Le pH du milieu réactionnel est de 7,2. Les réactions ont été laissées à température ambiante toute une nuit. Le témoin a été réalisé sans enzyme.

Ces premières manipulations pour étudier la possibilité d'une activité caféoyl-CoA : chlorogénate caféoyltransférase des HCTs et HQTs n'ont pas été fructueuses. Aucune production de diCQA n'a pu être mise en évidence. L'étude de l'activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase de ces enzymes a été entreprise de la même manière *via* la réalisation de tests enzymatiques *in vitro*.

1.2 Activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase

Pour pouvoir étudier la potentielle activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase de chacune des HCTs et HQTs, des incubations ont été réalisées durant toute une nuit en présence de CQA uniquement. Dans chaque cas, 500 ng d'enzyme ont été mis en présence de 2 mM de CQA

(figure 3.3). Deux pH ont été testés (6 et 7,2). Aucune enzyme ne semble capable de synthétiser le diCQA, et ceci dans les 2 conditions de pH.

Le 5-CQA a également été utilisé comme substrat potentiel, mais les résultats ont été de la même façon non fructueux.

Ainsi, les enzymes de la famille des BAHD identifiées dans cette étude ne semblent pas être capables de catalyser la production de diCQA. Les conditions optimales pour observer une production n'ont peut-être pas été testées. Des différences structurales au niveau des séquences protéiques des enzymes de la chicorée peuvent expliquer les spécificités des enzymes HCT et HQT identifiées respectivement chez le café et la tomate capables de synthétiser le diCQA.

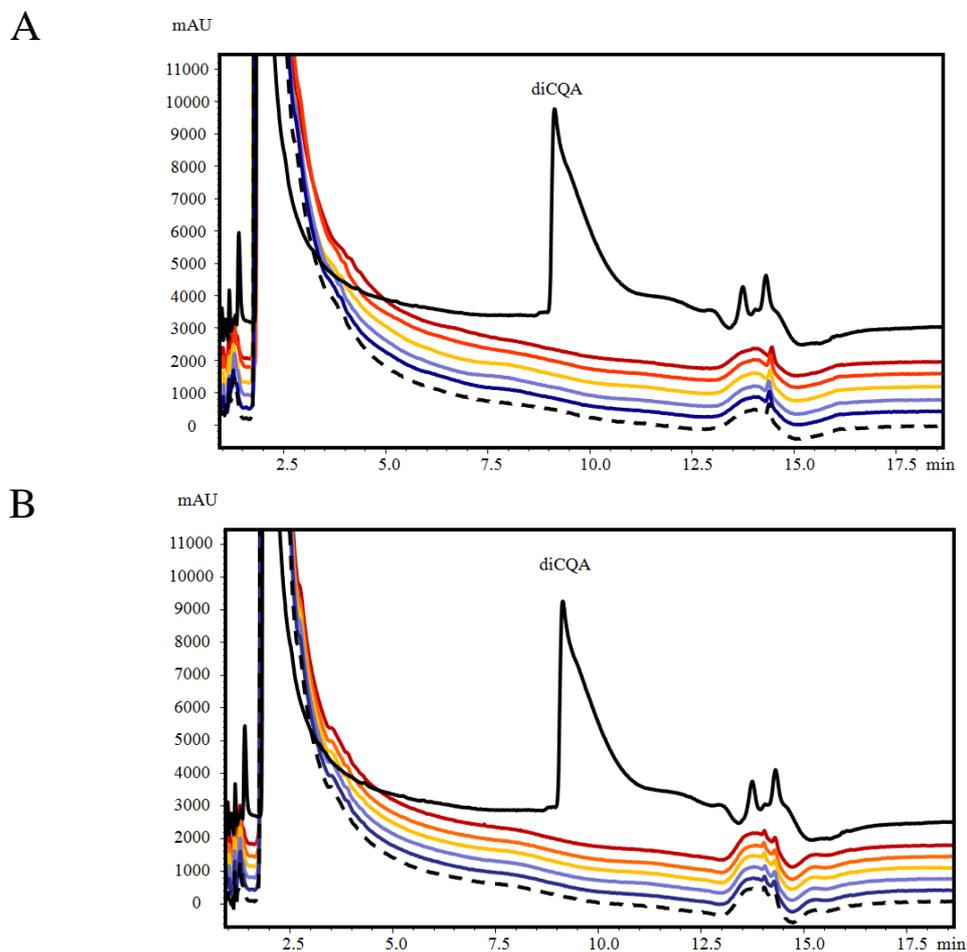


Figure 3.3 : Chromatogrammes obtenus à l'issue de l'incubation des HCTs et HQTs recombinantes en présence de CQA uniquement, à pH 6 (A) et 7,2 (B).

Les réactions ont été démarrées avec 500 ng d'enzyme en présence de 2 mM de CQA. Le tracé en pointillés correspond à un témoin sans enzyme, le tracé noir à un mélange CQA (250 μM) – diCQA (25 μM), le tracé bleu foncé au résultat d'analyse de produits réactionnels avec **HCT1**, en bleu clair avec **HCT2**, en orange, avec **HQT1**, en rouge, avec **HQT2** et en rouge grenat, **HQT3**. Les réactions ont été laissées à température ambiante toute une nuit.

1.3 Analyse structurale des séquences protéiques

Une HQT de tomate, SIHQT, est capable de synthétiser, certes dans de faibles proportions, le diCQA (Moglia *et al.*, 2014). Une étude de sa structure a été menée par Moglia et son équipe afin de mettre en relation des acides aminés de la séquence protéique avec cette activité enzymatique. L'activité d'un mutant, dont l'acide aminé en position 276 a été modifié (histidine en tyrosine), a été comparée avec celle d'une enzyme non mutée. Il en résulte que la capacité de production en diCQA de la protéine mutée est affectée négativement. D'après ces résultats, il semblerait que l'activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase soit dépendante de la nature de cet acide aminé. Des alignements de séquences d'enzymes proches de SIHQT (HQT d'artichaut, HCT et HQT de café, HQT de patate douce, HQT de pomme de terre...) montrent qu'un acide aminé « histidine » ne semble être présent que chez les Solanacées (tomate, SIHQT : His-276 et pomme de terre, StHQT : His-281) (figure 3.4). La chicorée possède à ce niveau de la séquence un acide aminé « tyrosine » quelque soit l'enzyme (CiHCT1 : Tyr-281, CiHCT2 : Tyr-277, CiHQT1 : Tyr-285, CiHQT2 : Tyr-286, CiHQT3 : Tyr-288). Cela pourrait expliquer, en partie, l'incapacité de nos enzymes à produire du diCQA, tout comme la HQT d'artichaut (CcaHTQ : Tyr-281).

	5	15	25	35	45	55	65	75	85
Ci_HCT1	-----M	KIEVRESTMV	RPAEETP--K	INLWNSNDLV	VVPNFHTPSV	YFYRPNNGAIN	FFDPKVMKDA	LSKALVPFYP	MGGRLKRDED
Ci_HCT2	-----M	KIAIRESTMV	RPAEETP--R	IKLWNSNDLV	VVPNFHTPSV	YFYRPTGATN	FFDAKVMKDA	LSRALVPFYP	MGGRLKRDED
Cc_HCT	-----M	KIEVKESTMV	RPAQETP--G	RNLWNSNDLV	VVPNFHTPSV	YFYRPTGSSN	FFDAKVLKDA	LSRALVPFYP	MAGRLKRDED
Ci_HQT1	MTNGAGSEKM	KVTVKESVIV	KPSKTPP--M	QRLWNSNDLV	LVGRIHLLTI	YFYRPNNGSSD	FFDSGVLKKA	LSDLVVSFFP	MAGRLKGDGD
Ci_HQT2	--MRSDQKMM	NINLKKSSII	PPSETIAECP	KQLWNSNDLV	VVGRIHILTV	YFYRPNNGSAN	FFDPNVMKKA	LADLVVSFFP	MAGRLDRDES
Ci_HQT3	--MGSDHKTMK	--INIKQSSLV	QPSKPTIPSN	KKLWNSNDLV	VVGRIHILTV	YFYRPNNGCSN	FFDPVVMKKA	LADLVVSFFP	FAGRLSRDQN
Cc_HQT	-----M	KITVKETAMV	RPAQPTP--T	KRLWNSNDLV	LVARIHILTV	YFYKPNNGSAN	FFDTRVLKEA	LSNVLVSFYP	MAGRLARDEE
SI_HQT	---MGSEKMM	KINIKESTLV	KPSKPTP--T	KRIWSSNDLV	IVGRIHLLTV	YFYKPNNGSSN	FFDNKVIKEA	LSNVLVSFYP	MAGRLGRDEQ
Cca_HQT	-----M	ELTVKESLMV	KPSKPTP--N	QRLWNSNDLV	VVGRIHILTV	YFYRPNNGSSN	FFDSGVLKKA	LADLVVSFFP	MAGRLGNDGD
Ib_HQT	---MASEK--F	KISIKESTMV	KPAKPTP--A	KRLWNSNDLV	IVGRIHLLTV	YFYRPNNGSPN	FFDSKVMKEA	LSNVLVSFYP	MAGRLARDEE
ST_HQT	---MGSEKMM	KINIKESTLV	KPSKPTP--T	KRIWSSNDLV	IVGRIHLLTV	YFYKPNNGSSS	FFDNKVMKKA	LSNVLVSFYP	MAGRLARDEQ
	95	105	115	125	135	145	155	165	175
Ci_HCT1	GRIEIDCQGG	GVLFVEAESD	GMVDDFGDFA	PTLELRKLLP	AVDYSQGIES	YPLLVLQVTV	FKCGGVS LGV	GMQHHAADGA	SGLHFVNTWS
Ci_HCT2	GRIEIDCQGG	GVLFVEAESD	GVDDDFGDFA	PTLELRKLLP	AVDYSLGIES	YSLLVLQVTV	FKCGGVS LGV	GMQHHAADGA	SGLHFINTWS
Cc_HCT	GRIEIECNGE	GVLFVEAESD	GVDDDFGDFA	PTLELRRLIP	AVDYSQGIES	YALLVLQVTV	FKCGGVS LGV	GMRHHAADGF	GMRHHAADGF
Ci_HQT1	GRVEINCNAE	GVLFVEAEAD	SCIDDFGEIT	PSPELRRLLP	TVDYSGDISS	YPLFIQVTR	FKCGGVS LGV	GLHHTLSDGL	SSLHFINTWS
Ci_HQT2	GRVINCNGE	GVLFVEAESD	STLDDFGEFT	PSPEFRRLTP	TVDYSGDISS	YPLFFAQVTH	FKCGGVALGC	GVFHTLSDGL	SSLHFINTWS
Ci_HQT3	GRLEINCNGE	GVLFVEAESD	STLDDFGEFT	PSPELRRSLP	TVDYSGDISS	YPLFFAQVTH	FKCGGVS LGV	GVFHTLSDGL	SSLHFINTWS
Cc_HQT	GRIEIDCNGE	GVLFVEAESD	SSVDDFGDFA	PSPELRRLLP	TVDYSGDISS	YPLVIFQVTR	FKCGGVALGC	GVQHNLSOGL	SSLHFINTWS
SI_HQT	GRVEINCNGE	GVLFVEAESD	SCVDDFGDFT	PSLELRKLLP	SVETS GDIST	FPLVIFQVTR	FKCGGVALGC	GVFHTLSDGL	SSLHFINTWS
Cca_HQT	GRVEINCNGE	GVLFVEAEAD	SCIDDFGEIT	PSPELRRLLP	TVDYSGDISS	YPLCIQVTR	FNCGGVSLGC	GLHHTLSDGL	SSLHFINTWS
Ib_HQT	GRIEIDCNEE	GVLFVEAESD	ACVDDFGDFT	PSLELRKLLP	TVDYSGDISS	FPLIIFQVTR	FKCGGVS LGV	GVFHTLSDGL	SSLHFINTWS
ST_HQT	GRIEIVNCGE	GVLFVEAESD	SCIDDFGDFT	PCLELRKLLP	SVETS GDIST	FPLAIFQVTR	FKCGGIALGC	GVFHTLSDGL	SSLHFINTWS
	185	195	205	215	225	235	245	255	265
Ci_HCT1	DMARGLDLTI	PPFIDRTLLR	ARDPPQPAFE	HVEYQPAPQM	KTKSK--STDE	QVPVETAVAI	FKLTRDQLNA	LKAKSKEGNG	TINYSSEYML
Ci_HCT2	DMARGLDVSL	PPFIDRTLLR	AQDPPRPVFE	HVEYQPAPPM	KSTSE--STSD	---ETVVSIM	FKLTRDQLNV	LKAKSKEAGN	TINYSSEYML
Cc_HCT	DMARGLDVTL	PPFIDRTLLR	ARDPPQPAFE	HIEYQPPAL	KVSPQ--TAKS	DSVPETAVAI	FKLTRDQLNA	LKAKSKEADN	TISVSSYEML
Ci_HQT1	DVARGLSVAI	PPFNDRTLR	ARDPPTPMFD	HVEYHPPPSL	ITPPEN----	--HKPPATTTI	LRLTLDOIND	LKSKGKGDGS	--VYHSTFVII
Ci_HQT2	DMARGLSVAI	PPFIERTLLR	AREPPTPTHQ	HVEYHEPPSM	SPTTQ----	KSGSGSSTTM	LKLTLDOINT	LKVKAKIESG	---QTHSTYEIL
Ci_HQT3	DMTRGLSIAV	PPFTDRTLR	AREPPTPTHQ	HVEYHPPPTM	NTTSQN--P	KSSRKPSTNM	LKLTIQQLNA	LKTAAKNDNY	NATYSTYEIL
Cc_HQT	DIARGLTIAV	PPFIDRTLLR	ARDPPVVFVE	HVEYPPPPQL	KSDSRIQELK	TGPRASTTAV	LKITPEQLSQ	LKAKANNEGS	-----TYEIL
SI_HQT	DIARGLSVAI	PPFIDRTLLR	ARDPPTYSFE	HVEYHPPPTL	NSSK--NRE--	-----SSTTTM	LKFSSEQLGL	LKSKSKEGNS	-----TYEIL
Cca_HQT	DKARGLSVAI	PPFIDRSLR	ARDPPTAMFE	HLEYHPPPSL	IAPSQNQNF	SHPKLASTAM	LRLTLDOIND	LKSKAKGDGS	---VYHSTYEIL
Ib_HQT	DMARGLSVAI	PPFIDRTLLR	ARDPPTPAFE	HSEYDPPPKL	KVSP--ESKR	GS--SASTTM	LKITPEQLAL	LKTKSKEGNS	-----TYEIL
ST_HQT	DIARGLSVAI	PPFIDRTLLR	AREPPTSSFE	HVEYHPPPTL	ISSK--KGES	TGPKSSSTAM	LKFSSSEQVGL	LKSKSKEGNS	-----TYEIL
	275	285	295	305	315	325	335	345	355
Ci_HCT1	SGHVRCVCK	ARNLPADQDT	KLYIATDGRA	RLRPSLPPGY	FGNVIFTTTP	IAVAGELMSN	PTWYAAGKIH	DGLAKMDNDY	LKSALDYLEL
Ci_HCT2	SGHVRSVCK	ARGLPEDQDS	KLYIATDGRA	RLQPALPPGY	FGNVIFTTTP	IAAAGDLQSK	PTWYAASKIH	DALVKMDNDY	LKSALDYLEL
Cc_HCT	AGHVRCACK	ARGLVEDQGT	KLYIATDGRA	RLRPSLPPGY	FGNVIFATP	IAIAGDLFEK	PVWYAASKIH	DALARMDNDY	LRSALDYLEL
Ci_HQT1	AAHLWRACK	ARGLSDDQPT	KLYIATDGRS	RLPPLPPGY	LGNVLFTTTP	MAKSSEFKSE	SLADTARRIH	TELARMDDY	LRSALDYLEL
Ci_HQT2	AAHIWRACK	ARGLPDDQLT	KLYIATDGRS	RLSPRLPPGY	LGNVVFATP	VAKSGLTSG	SLSNTAKLTH	TTLTKMDDDY	LRSALDYLEL
Ci_HQT3	AAHLWRACK	ARGLPNDQQT	KLYIATDGRS	RLSPQLPPGY	LGNVVFATP	MAKSSELTQ	PLNSASLTH	STLSKMDNEV	LRSALDYLEL
Cc_HQT	AAHIWRACK	ARGLTNDQST	KLYIATDGRS	RLPPLPPGY	LGNVVFATP	IAESSNLQSE	PLTNSAKRIH	NALARMDNDY	LRSALDYLEL
SI_HQT	AAHIWRACK	ARGLPEDQLT	KLYIATDGRS	RLCPPLPPGY	LGNVVFATP	IAKSSELQSE	PLTNSAKRIH	NELTKMDNDY	LRSALDYLEL
Cca_HQT	AAHLWRACK	ARGLSDDQPT	KLYIATDGRS	RLNPLPPGY	LGNVVFATP	IAKSSEFKSE	SLADTARRIH	SELAKMDQDY	LRSALDYLEL
Ib_HQT	AAHIWRACK	ARGLTDDQAT	KLYIATDGRS	RLCPPLPPGY	LGNVVFATP	MAESGELQSE	PLTNSAKRIH	SALARMDDEY	LRSALDFLEC
ST_HQT	AAHIWRACK	ARGLADDQLT	KLYIATDGRS	RLCPPLPPGY	LGNVVFATP	IAKSSELQSE	PLRNSVKRIP	NELTKMDNDY	LRSALDYLEL
	365	375	385	395	405	415	425	435	445
Ci_HCT1	QPDLKALVRG	AHSFRCPNLG	ITSWARLPIH	DADFGWGRPI	FMGPGGIAYE	GLSFVLPSPPI	-NDGSLIAI	SLQAEHMKVF	SKFLYDI
Ci_HCT2	QPDLKALVRG	AHTFKCPNLG	ITSWARLPIH	DADFGWGRPI	FMGPGGIAYE	GLSFVLPSPV	-NDGSLWIAI	SLGHEHMKLF	SKFLYDI
Cc_HCT	QPDLKALVRG	AHTFKCPNLG	ITSWARLPIH	DADFGWGRPI	FMGPGGIAYE	GLSFILPSPPT	-NDGSMVAI	SLGHEHMKLF	QSFLYDI
Ci_HQT1	QPDLALVRG	PTYFASPNNL	VNSWTRLPY	ESDFGWGRPI	FMGPANILYE	GTIYIIPSPPT	-DDRSKLAV	CLDSDHMSLF	QKLYYDF
Ci_HQT2	QKDLALVRG	PSYFASPNNL	INAWTRLPVH	DADFGWGRPI	FMGPAQILYE	GTIYVLPSPN	-NDRSVSLAV	CLDANEQPLF	EKFLYEM
Ci_HQT3	QPDLALVRG	PSYFASPNNL	INAWTRLPVH	DADFGWGRPI	FMGPAVILYE	GTIYVLPSPN	-NDRSMLAV	CLDANEQPLF	EKFLYEF
Cc_HQT	QPDLALVRG	PRHFASPNNL	INSWTRLPFH	DADFGWGRPI	HIGPAIILYE	GTIYVLPSPG	-KDRTLSLAV	CLDADHMPFL	QKLYYDF
SI_HQT	QPDLSTLRG	PAYFASPNNL	INSWTRLPVH	ESDFGWGRPI	HMGPAACILYE	GTIYIIPSPN	SKDRNRLAV	CLDAGHMSLF	EKFLYEL
Cca_HQT	QPDLALVRG	PTYFASPNNL	INSWTRLPY	ESDFGWGRPI	FMGPASILYE	GTIYIIPSPS	-GDRSVSLAV	CLDSDHMSLF	REKLYDF
Ib_HQT	QPDLKALVRG	SNYFASPNNL	INSWTRLPVH	ESDFGWGRPI	HMGPAACILYE	GTIYIIPSPN	-KDRTLSLAV	CLDAEHMSLF	KLFLYDF
ST_HQT	QPDLSTLRG	PTYFASPNNL	INSWTRLPVH	ESDFGWGRPI	HMGPAACILYE	GTIYIIPSPN	TKDRNRLAV	CLDSDHMPFL	EKLYC--

Figure 3.4 : Alignement de séquences appartenant à la famille des HCT et HQT de plantes. Ci_HCT1, Ci_HCT2, Ci_HQT1, Ci_HQT2 et Ci_HQT3 de chicorée, EF137954 (Cc_HCT) et EF153931 (Cc_HQT) de café, NP_001234850 (SI_HQT) de tomate, ABK79689 (Cca_HQT) d'artichaut, BAA87043 (Ib_HQT) de patate douce et ABA46756 (ST_HQT) de pomme de terre.

De prime abord, les HCTs et HQTs de chicorée ne semblent pas être impliqués dans la synthèse de diCQA. Deux possibilités peuvent être envisagées : soit une autre enzyme est responsable de la synthèse de diCQA chez la chicorée, soit les conditions propices à la synthèse de diCQA par les HCTs et HQTs décrites ci-avant non pas été testées dans cette étude. Néanmoins, il

paraît peu probable que ces enzymes soient responsables de l'accumulation de fortes teneurs en diCQA dans certains cas (racines, jeunes feuilles, cf chapitre 1). En effet, l'action des HCT et HQT, d'après la littérature, serait tournée vers la synthèse de diCQA qu'en cas de fortes teneurs en CQA (Lallemand *et al.*, 2012 ; Moglia *et al.*, 2014). Or, nous avons pu voir dans le chapitre 1, que les jeunes feuilles renfermaient des teneurs en diCQA plus importantes par rapport à des feuilles plus âgées. Cela n'est pas le cas du CQA. Les HCT et/ou HQT pourraient être particulièrement efficaces pour contrebalancer une forte augmentation en CQA et ainsi rendre imperceptibles les évolutions de teneurs en CQA. Cependant, cela semble peu probable étant donné les faibles efficacités en ce sens des SIHQT et CcHQT.

C'est pourquoi, dans une deuxième partie, nous allons traiter des travaux visant à mettre en évidence l'existence d'une ou plusieurs autres protéines comme cela semble être le cas chez la patate douce. Les investigations seront menées en s'inspirant des travaux de Villegas (Villegas *et al.*, 1987).

2 Validation et mise au point du protocole de purification de l'ICS chez la patate douce

Une activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase, que l'on qualifiera également dans cette partie d'activité isochlorogénate synthase, a été mise en évidence chez la patate douce. Un protocole de purification de la protéine responsable a été établi. Cette enzyme permet le transfert d'un groupement caféoyle d'un CQA vers un autre CQA (figure 3.5).

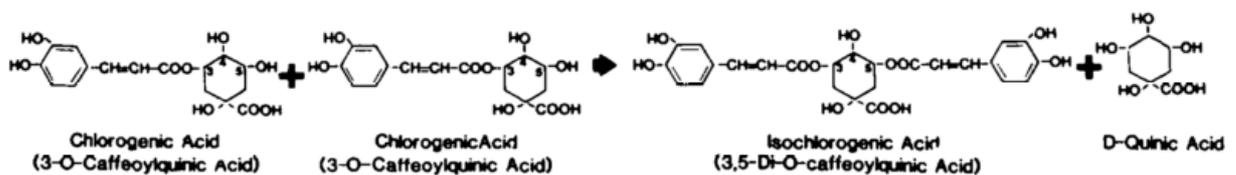


Fig. 1. Enzymatic reaction catalysed by chlorogenic acid:chlorogenate caffeoyl transferase

Figure 3.5 : Réaction enzymatique catalysée par l'isochlorogénate synthase (ICS) chez la patate douce (d'après Villegas *et al.* 1987)

Elle a été purifiée à partir de tubercules de patate douce et caractérisée. Cette enzyme correspond à un polypeptide simple de 25 kDa (50 kDa pour les HCT et HQT) et son pI serait de 4,6. Ce pI est plus faible que celui des HCTs et HQTs de chicorée (CiHCT1, pI = 6 ; CiHCT2, pI = 5,8 ; CiHQT1, pI = 6,3 ; CiHQT2, pI = 6 ; CiHQT3, pI = 6,5). Le pH optimal pour cette réaction est de 5. Enfin, Cette enzyme ne nécessite pas l'intervention de cofacteurs et a une très forte affinité pour le CQA ($K_m = 0,87\text{mM}$), auquel elle semble être exclusive (Villegas *et al.*, 1987). Le protocole est amorcé par une incubation de disques de tubercules de patate douce favorisant l'augmentation de l'activité de l'ICS et l'accumulation consécutive des CQA et diCQA dans les tissus. Le protocole de purification est résumé dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Protocole de purification de l'ICS chez la patate douce (d'après Villegas *et al.* 1987)

Table 1. Summary of the purification of chlorogenic acid:chlorogenate caffeoyl transferase from sweet potato roots

Purification step	Total protein (mg)	Total enzyme activity (units)	Specific enzyme activity (units/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	2380	615	0.26	1	100
Ammonium sulphate	725	270	0.37	1.4	44
Sephadex G-25	470	170	0.36	1.4	28
DEAE-Toyopearl	200	240	1.20	4.6	29
DEAE-Sephacel	12	115	9.58	37	19
Hydroxyapatite	2.9	50	17	66	8
Superose 12	0.38	29	76	290	5
Polyacrylamide gel electrophoresis	0.015	14	930	3600	2

The enzyme was extracted from 1423 g of sweet potato root slices which had been incubated for 2 days and assayed using the standard method described in the Experimental.

Grâce à ce protocole, l'enzyme a été purifiée et caractérisée biochimiquement. Néanmoins, depuis ces travaux, aucune identification moléculaire n'a été menée pour donner suite à ces résultats.

C'est dans cette optique, que nous sommes repartis de cette étude afin de mener à terme cette identification protéique. Il a fallu, dans un premier temps, travailler le protocole : vérification de l'induction de la voie métabolique, suivi de l'activité de l'ICS, conditions optimales de précipitation au sulfate d'ammonium, choix du pH et tampon de réaction, ajustements des étapes de séparation...

2.1 Induction de la synthèse de diCQA

En amont du protocole de purification, des conditions d'activité forte de la voie métabolique menant à la synthèse de diCQA ont été recherchées. En effet, l'hypothèse d'une expression plus forte du gène codant l'ICS en cas de synthèse accrue de diCQA est émise. Nous avons reproduit les conditions proposées par Villegas *et al.* (1987). L'incubation de disques de racines de patate douce sur papier filtre imbibé d'eau distillée (48 h, à l'obscurité, 25 °C) permet une accumulation significative du polyphénol d'intérêt dans le tissu racinaire en comparaison avec les racines non incubées (figure 3.6).

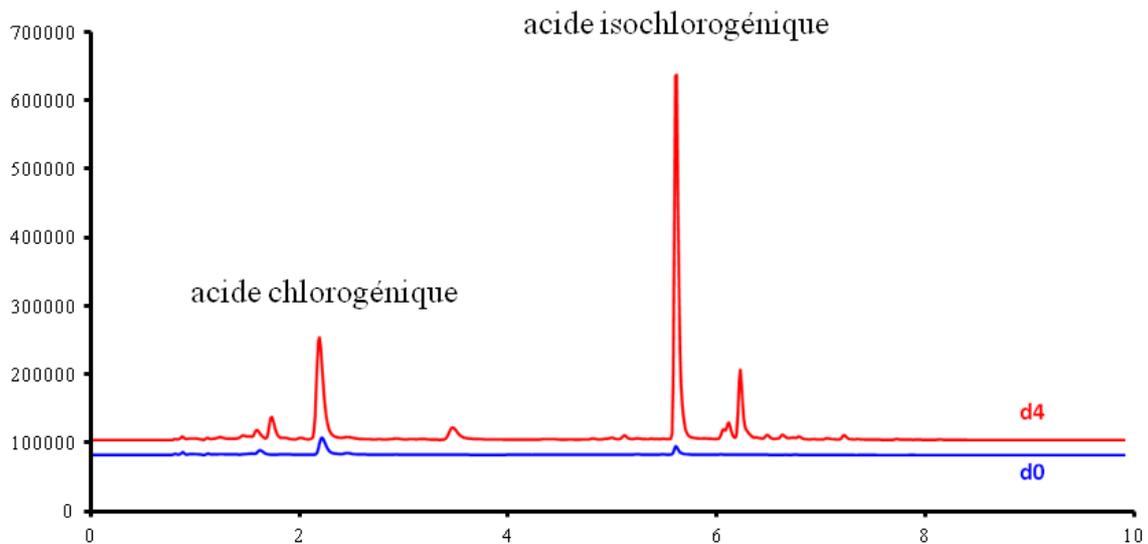


Figure 3.6 : Chromatogramme obtenu par HPLC-UV d'extraits méthanoliques de disques de racines de patate douce incubés pendant 4 jours à l'obscurité (en rouge) ou non incubés (en bleu).

Afin d'ajuster les conditions d'incubation, des disques ont été incubés pendant différents temps et leur contenu en polyphénols analysé (figure 3.7).

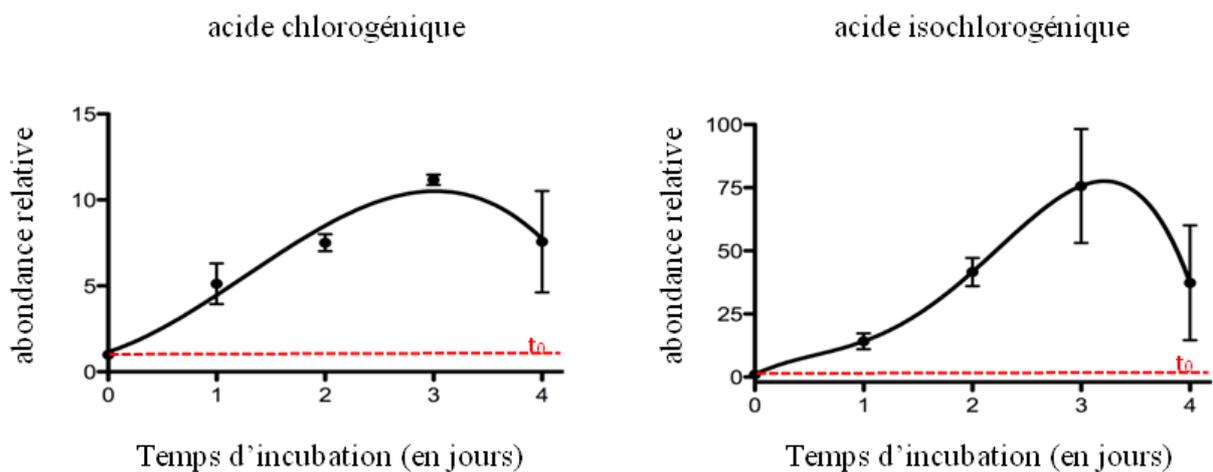


Figure 3.7 : Evolution des abondances relatives en CQA et en diCQA en fonction de la durée d'incubation des disques de patate douce par rapport au t0. La valeur du t0 est fixée ici à 1 dans le cas du CQA et du diCQA.

Les quantités en CQA et diCQA sont respectivement multipliées par 10 et 25 après 3 jours d'incubation. Ces données permettent de valider le choix de la patate douce comme matériel végétal et la méthode d'induction de la voie métabolique. De plus, l'existence d'un lien entre l'activité de l'ICS et la quantité de CQA peut être établi.

Une durée d'incubation de 2 jours semble correcte pour constater une augmentation significative des teneurs en polyphénols. Ce choix sera conservé pour la suite des investigations. C'est une période suffisante pour à la fois induire des différences d'accumulation et pour garder un matériel sain. En effet, après 3 jours d'incubation, on constate une diminution des teneurs en CQA et diCQA qui a lieu en parallèle à un brunissement des disques, signe d'un début d'altération du matériel.

Enfin, il a fallu en ce début de protocole s'assurer que le composé ciblé était bien le diCQA, plus précisément le 3,5-diCQA (figure 3.8). Les conditions chromatographiques permettent une nette séparation des CQA, 1,3-diCQA, 3,4-diCQA et 4,5-diCQA. Le 1,5-diCQA et le 3,5-diCQA sont beaucoup plus difficiles à séparer. Cela est d'autant plus difficile que les spectres d'absorption de ces diCQA sont très proches (figure 3.9). En référence à la littérature, nous considérons alors que le pic produit lors de nos tests enzymatiques est le 3,5-diCQA (Villegas *et al.*, 1987).

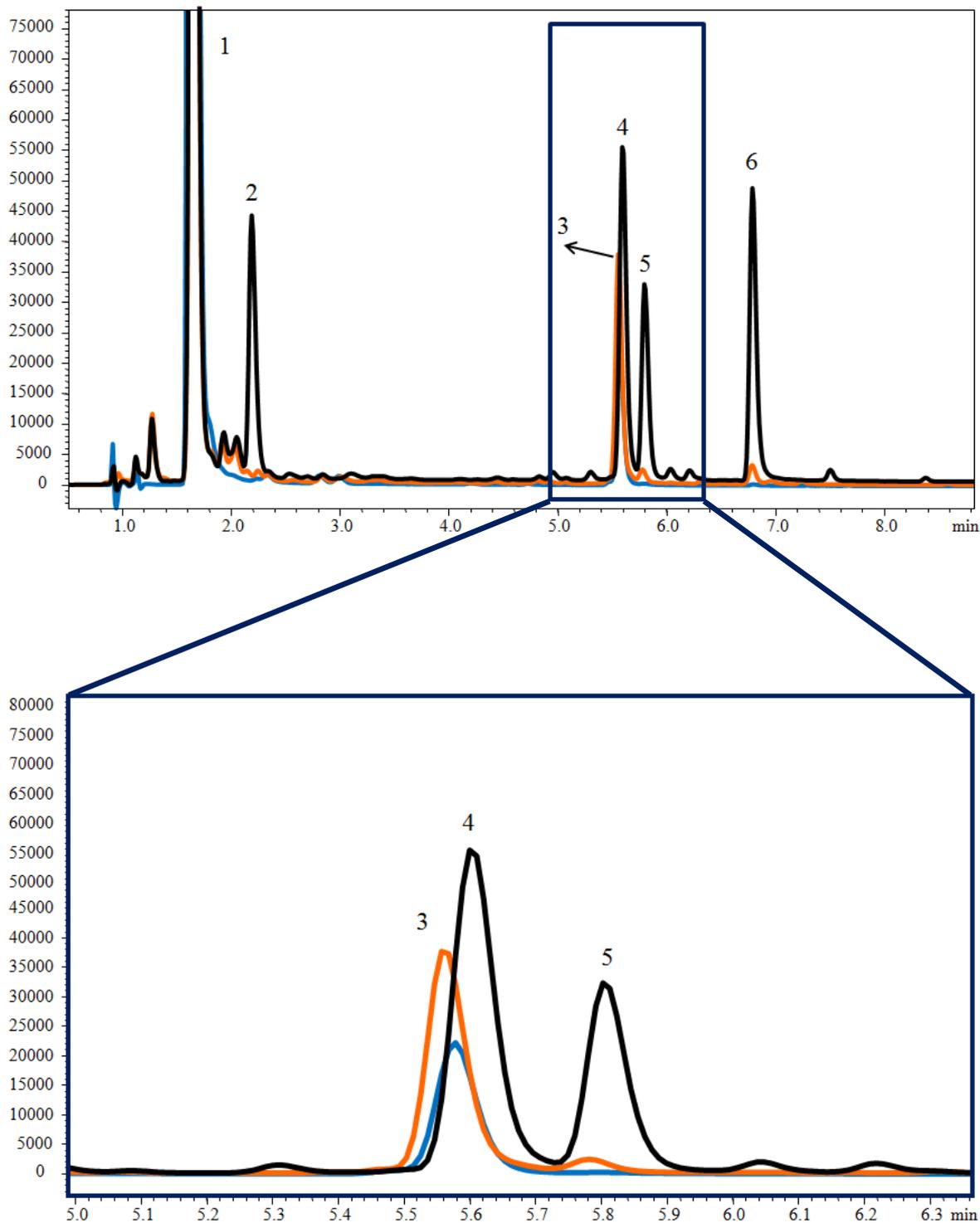


Figure 3.8 : Chromatogrammes obtenus par HPLC-UV de mélange de standards et d'extrait résultant d'un test enzymatique à partir d'extrait protéique de patate douce.

noir : chromatogramme d'un mélange de standards (CQA, 1,3-diCQA, 1,5-diCQA, 3,4-diCQA et 4,5-diCQA)

bleu : chromatogramme d'un mélange de standards (CQA et 3,5-diCQA)

orange : chromatogramme résultant de test enzymatique réalisé à partir d'extrait protéique de patate douce

1 : CQA ; 2 : 1,3-diCQA ; 3 : 3,5-diCQA ; 4 : 1,5-diCQA ; 5 : 3,4-diCQA et 6 : 4,5-diCQA

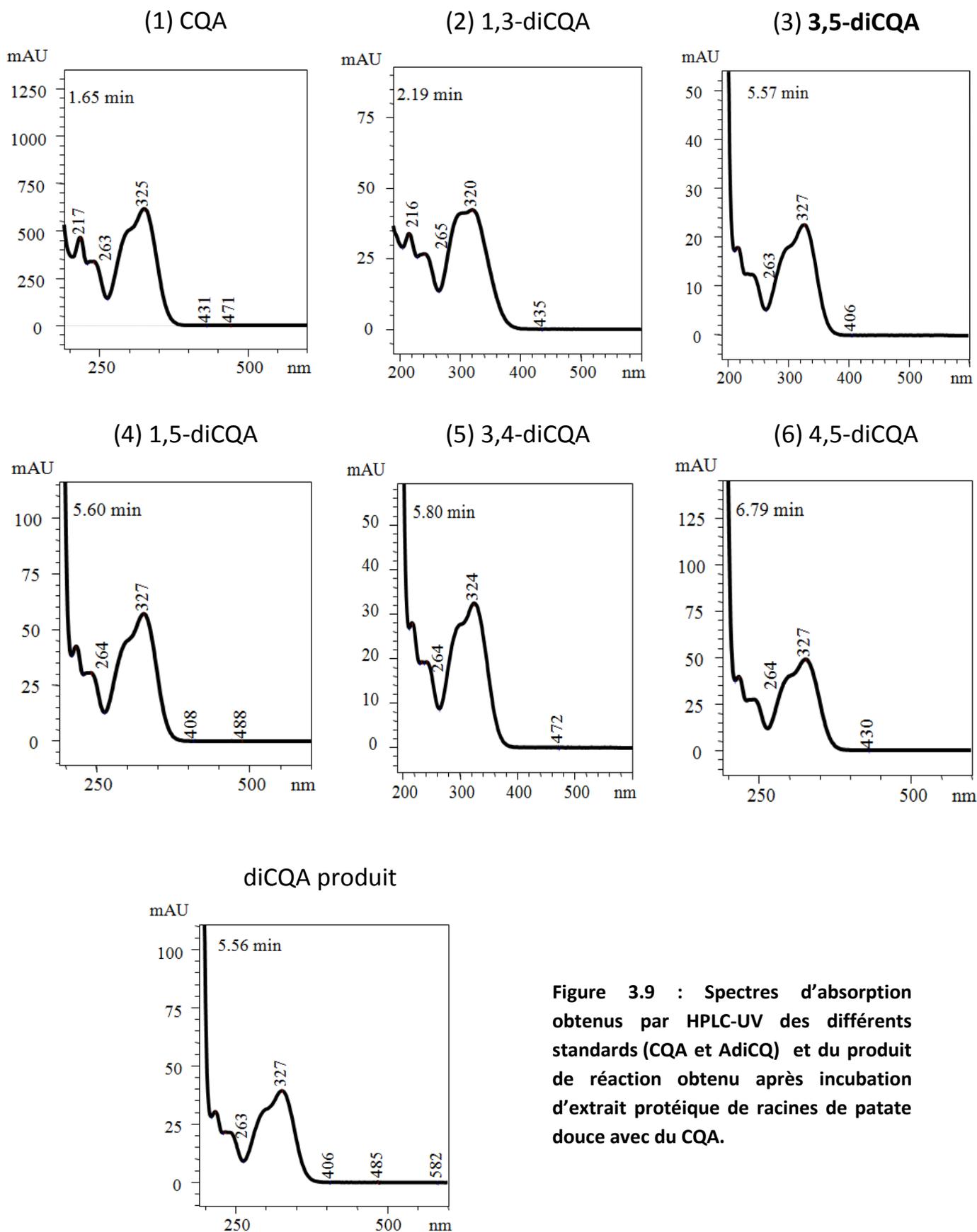


Figure 3.9 : Spectres d'absorption obtenus par HPLC-UV des différents standards (CQA et AdicQ) et du produit de réaction obtenu après incubation d'extrait protéique de racines de patate douce avec du CQA.

2.2 Suivi de l'activité enzymatique

Il est important dans la mise au point d'un protocole de purification d'avoir un moyen rapide et fiable pour cibler la protéine d'intérêt et la suivre tout au long des travaux. Dans notre cas, le test consiste à suivre, après ajout d'une fraction de l'extrait, la production de diCQA dans un milieu avec du CQA fourni en concentration connue. Si c'est le cas, l'extrait est doté de l'activité biosynthétique attendue et peut être alors qualifié d'actif. Par conséquent, il doit contenir une part des enzymes ciblées dans nos recherches. L'identification et la quantification des composés se font par HPLC-UV.

Un premier test a été réalisé sur un extrait brut de patate douce (figure 3.10). Les disques ont simplement été broyés dans un tampon d'extraction (tampon constitué de 50 mM de tampon Hepes-KOH (pH 7,5), 2 mM d'EDTA, 10 mM de $MgCl_2$, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF, 10 % de glycérol et 10 % de PVPP). L'homogénat est ensuite filtré sur mousseline et centrifugé. Le surnageant a ensuite subi un dessalage sur une colonne sephadex G25 (PD-10) dont le principe sera expliqué par la suite (§ 2.6 de ce chapitre – p 259). Ceci constitue l'extrait protéique brut. L'extrait enzymatique a été mis en contact avec deux concentrations différentes en CQA. La réaction est arrêtée après différentes durées et les milieux d'incubation sont analysés par HPCL-UV.

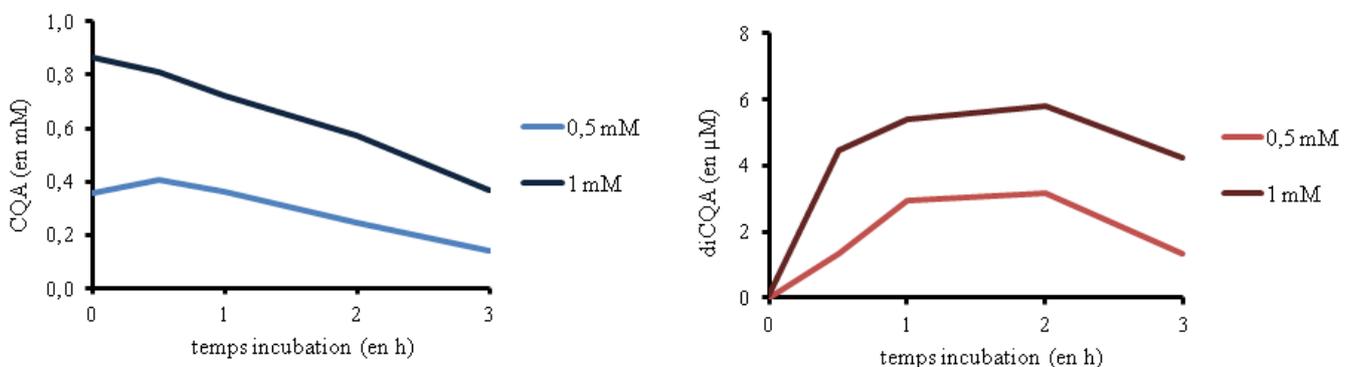


Figure 3.10 : Evolution des concentrations de CQA et de diCQA (respectivement en mM et μM) dans un milieu réactionnel contenant 1 ou 0,5 mM de CQA et un extrait protéique dessalé de racines de patate douce.

Une production de diCQA a lieu et celle-ci est dépendante de la durée d'incubation. En parallèle, une disparition de CQA est mise en évidence. Cependant, la relation stoechiométrique entre disparition de CQA et apparition de diCQA n'est pas respectée (ratio 2 / 1). Cela peut s'expliquer par le fait que l'extrait testé est à un stade de purification peu avancé. Le CQA doit être sujet à de nombreuses

dégradations enzymatiques (polyphénols oxydases...). Les résultats sont différents selon la concentration initiale du milieu en CQA (0,5 ou 1 mM). Cela montre que la teneur en diCQA produit dans le milieu dépend du CQA disponible et que ce dernier est mobilisé pour sa synthèse. Le K_m de l'ICS est de 0,87. Ainsi, avec une concentration de 0,5 mM en substrat, nous sommes en deçà cette valeur et avec 1 mM, légèrement au dessus, ce qui peut également justifier une telle différence. Les allures des courbes restent similaires peu importe la concentration initiale en CQA. La pente négative initiée à partir de 2h, pour la concentration en diCQA, peut aussi être imputée à l'action des PPOs.

Des réactions enzymatiques ont également été réalisées à partir d'un extrait brut bouilli de patate douce (100 °C pendant 10 min) en parallèle à un échantillon de ce même extrait non bouilli (figure 3.11).

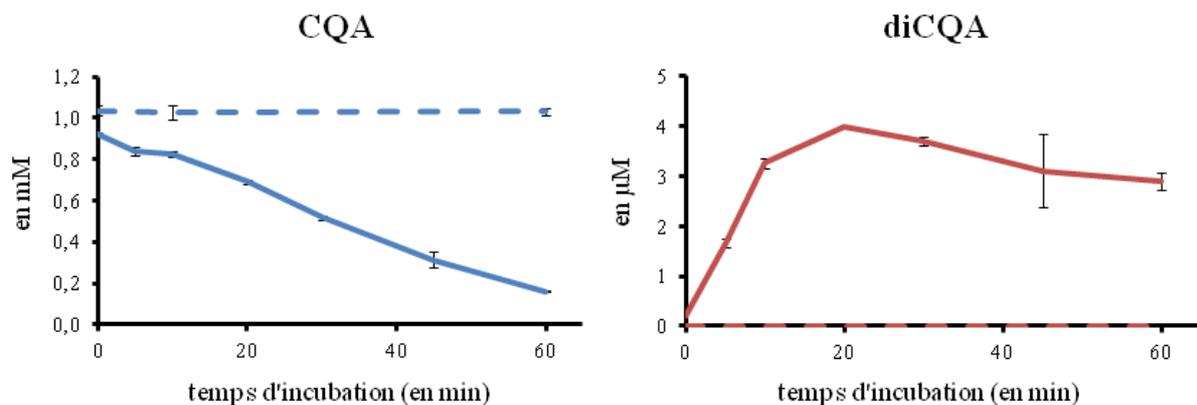


Figure 3.11 : Evolution des concentrations en CQA et diCQA (respectivement en mM et μM) en fonction du temps dans un milieu réactionnel contenant soit un extrait brut de patate douce bouilli (trait discontinu) ou non (trait continu).

On voit aisément que les tests enzymatiques à partir d'extrait bouilli ne résultent pas en la production de diCQA. D'autre part, aucune dégradation de CQA n'est constatée. A l'inverse, avec la fraction non bouillie, il y a bien production de diCQA et dégradation de CQA comme l'attestent les résultats des quantifications. Ainsi, ces évolutions des concentrations du milieu de réaction peuvent bien être affiliées à des activités protéiques. L'absence de variations quantitatives lorsque l'extrait subit une dégradation à haute température atteste de la présence dans l'extrait d'enzyme(s) entrant en jeu dans la synthèse de diCQA.

Afin d'éviter une perte trop importante de CQA et diCQA causée par les PPOs et d'éliminer les molécules qui interfèrent avec l'activité recherchée, une étape de broyage à l'acétone a été mise au

point après induction des disques de patate douce. Ceci avait été décrit dans l'article dont nous nous sommes inspirés (Villegas *et al.*, 1987).

2.3 Précipitation au sulfate d'ammonium

Le protocole de purification servant de référence comprend une étape de précipitation au sulfate d'ammonium en deux paliers (40-70%) (Villegas *et al.*, 1987). Cette technique utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa nature et sa composition en acides aminés, il est possible de les séparer en fonction de leur tendance à précipiter rapidement ou non lorsque l'on change la force ionique de la solution qui les contient. Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité des protéines : elle peut neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité et entrer en compétition avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est assez élevée pour priver une protéine des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci « sort de solution » et précipite : c'est le phénomène de salting-out. Certaines protéines sont remarquablement résistantes et précipitent dans le cas de teneurs élevées en sel, d'autres précipitent rapidement. C'est cette différence de solubilité qui permet de les séparer lors de cette étape de précipitation au sulfate d'ammonium.

Le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est le sel le plus classiquement utilisé en laboratoire pour précipiter les protéines. Sa solubilisation n'affecte pas la température de la solution, ne dénature pas les protéines et est d'un coût peu élevé.

En s'appuyant sur les résultats de Villegas, une première manipulation a été menée en appliquant une saturation au sulfate d'ammonium en deux étapes : élimination des protéines précipitées à 40 % de saturation, puis de nouveau précipitation jusqu'à 70 % de saturation et récupération du culot de protéines. Une fraction des protéines précipitées à 40 % a été mise de côté pour réaliser des tests enzymatiques (figure 3.12)

L'activité de synthèse de diCQA est clairement présente dans la solution résultant de la resolubilisation des protéines du culot récupérées après saturation à 40 % de sulfate d'ammonium. Ce résultat est différent de ce qui était attendu d'après les travaux de Villegas, car aucune trace de diCQA n'est décelable dans les milieux des tests enzymatiques à partir de la fraction 40-70 %.

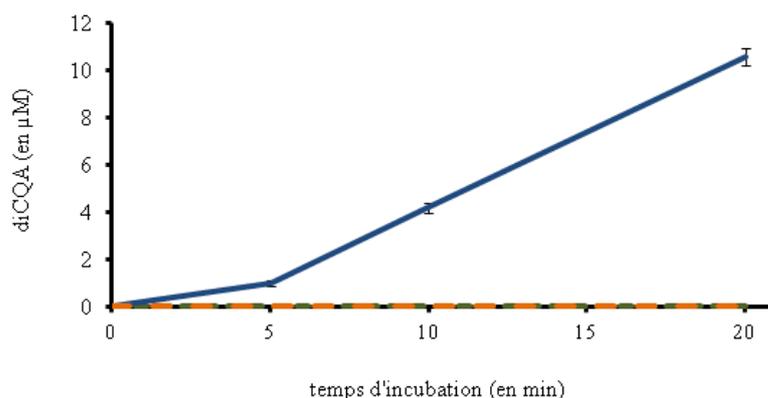


Figure 3.12 : Concentration en diCQA (en μM) en fonction du temps dans un milieu réactionnel contenant du CQA et un extrait protéique de patate douce. L'extrait protéique a d'abord été fractionné au sulfate d'ammonium et différentes fractions ont été analysées : 40% de saturation (**bleu**), 40-70% de saturation (**orange**), 40-70 % de saturation bouilli (**vert**). Les courbes relatives à 40-70% de saturation et extrait bouilli sont confondues et d'équation $[\text{diCQA}] = at + b = 0 \mu\text{M}$ (t est le temps en min, $a = b = 0$ dans ce cas).

Ainsi, dans le cadre d'une deuxième expérience, plusieurs niveaux de saturation successifs, inférieurs à 40 %, ont été testés (25 ; 25-30 % ; 30-35 % et 35-40 %) afin de fractionner de manière plus fine notre extrait. En parallèle, les quantités de protéines pour chacune des fractions ont été estimées par un test de Bradford (figure 3.13). L'enzyme d'intérêt semble présente dans chaque fraction testée, mais la force de production est différente et dépend du ratio de notre protéine sur les protéines totales. La fraction 25-30 % apparaît comme le niveau satisfaisant de purification. Cependant, lorsque l'on prend en compte la quantité totale de protéines pour approximer l'activité spécifique de production de diCQA après 15 min de réaction, nous obtenons les valeurs suivantes : $0,3 \mu\text{M} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines pour la fraction 25 % ; 1,1 pour 25-30 % ; 1,2 pour 30-35 % et 0,6 pour 35-40 %. Les fractions 25-30 % et 30-35 % sont donc finalement difficiles à différencier concernant leur performance biosynthétique. Pour la suite des études, le choix a donc été fait de conserver le culot de protéines après saturation de l'extrait enzymatique à 40 % de saturation de sulfate d'ammonium. Le gain en terme d'activité est manifeste en comparaison à l'activité de l'extrait avant précipitation au sulfate d'ammonium (figure 3.14). Ceci s'explique probablement par la combinaison de la précipitation des protéines et par la concentration de l'extrait. Après 15 min de réaction enzymatique, $14 \mu\text{M}$ de diCQA sont produits à partir de l'extrait issu de la précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 %) et seuls $2 \mu\text{M}$ dans le cas où cette étape de purification n'est pas réalisée. Enfin, le surnageant éliminé après précipitation au sulfate d'ammonium ne présente pas d'activité isochlorogénate synthase.

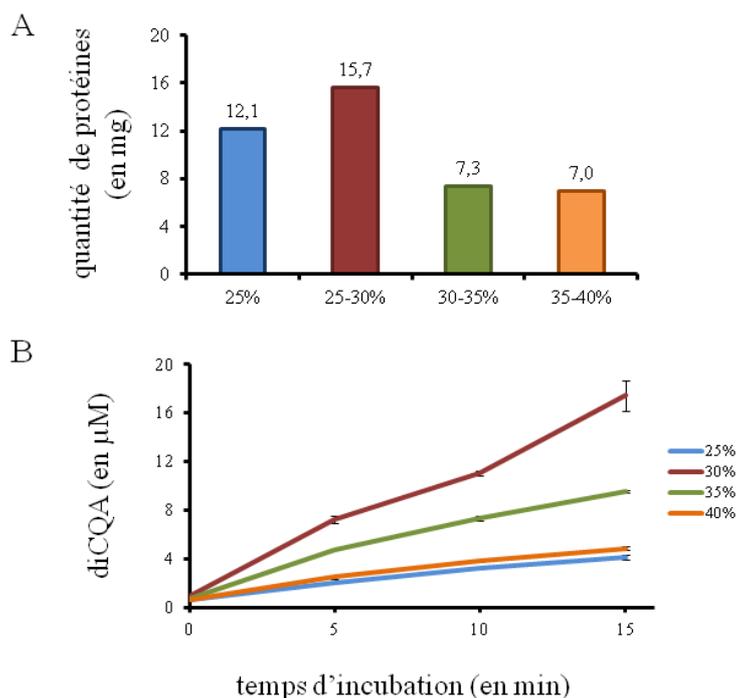


Figure 3.13 : Activité enzymatique de différentes fractions d'extrait protéique de patate douce obtenues par fractionnement au sulfate d'ammonium. Le pourcentage indique le % de saturation de l'extrait dont résulte la fraction après resuspension du culot protéique.

- A. Histogramme présentant la quantité en protéines de chaque fraction. L'extrait brut avant précipitation au sulfate d'ammonium contenait 87 mg de protéines.
- B. Concentration en diCQA (en μM) produit en fonction du temps de réaction enzymatique (en min) pour différents pourcentages successifs de saturation en sulfate d'ammonium d'un extrait brut de patate douce.

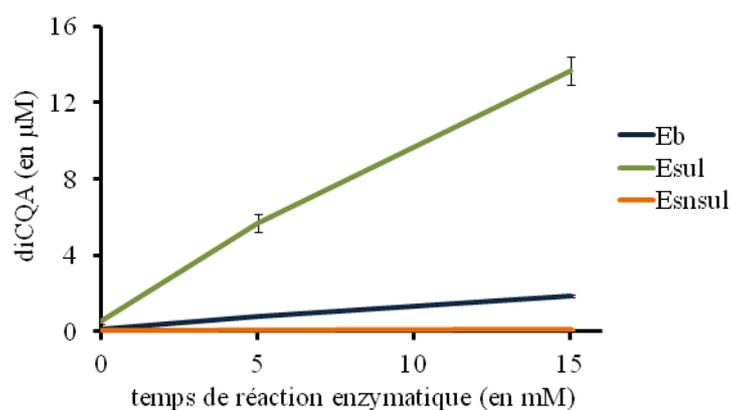


Figure 3.14 : Concentration en diCQA (en μM) produit en fonction du temps de réaction enzymatique (en min) pour différentes fractions issues du protocole de purification de l'ICS.

Eb = extrait brut, avant précipitation au sulfate d'ammonium ; Esul = extrait issu de la précipitation au sulfate d'ammonium (40 %) ; Esnsul = surnageant éliminé après précipitation au sulfate d'ammonium.

2.4 Choix du pH réactionnel

Le pH optimal de la réaction enzymatique a été recherché. Pour ceci, l'activité enzymatique a été mesurée dans un milieu réactionnel dont le tampon est ajusté à différents pH à partir d'un extrait issu de la purification après précipitation au sulfate d'ammonium (figure 3.15). Des tampons de natures différentes ont été testés afin d'élargir la gamme de pH.

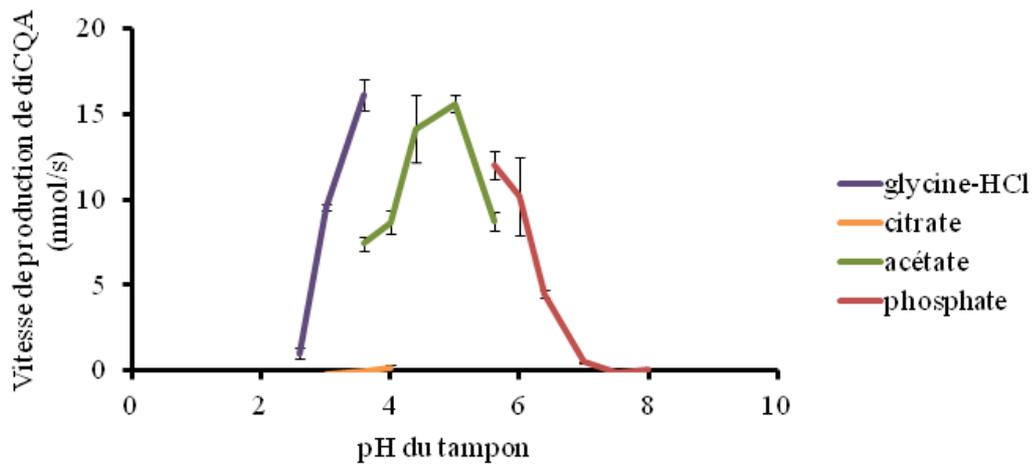


Figure 3.15 : Vitesse de synthèse du diCQA (en $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$) en fonction du pH du milieu enzymatique et de la nature du tampon. Les tests enzymatiques ont été réalisés à partir d'un extrait protéique de patate douce obtenu selon le protocole décrit ci-avant.

Les tampons acétate pH 5 et glycine-HCl pH 3,3 s'avèrent être les meilleures conditions de réalisation des tests enzymatiques. On peut noter l'incompatibilité du tampon citrate avec l'activité de l'ICS. Le citrate est présent dans un bon nombre de systèmes biologiques mais à de faibles concentrations (Stadtman et Chock, 1992). Il est un maillon important dans le cycle de Krebs, également appelé cycle de l'acide citrique et est formé au cours de ce cycle par condensation d'acétyl-CoA et d'oxaloacétate par la citrate synthase. Ce composé a un impact sur certaines protéines. En effet, l'action de certaines enzymes, telles que des pyruvate kinases est affectée négativement par le citrate (Duggleby et Dennis, 1973). A l'inverse, l'acétyl-CoA carboxylase est une enzyme qui intervient dans la biosynthèse des acides gras et est activée par l'acide citrique (Vagelos *et al.*, 1962). Il semblerait que le citrate soit également responsable d'une inhibition de la formation de phytoalexines comme cela a été montré *via* des cultures cellulaires de coton et de soja (Apostol *et al.*, 1987).

Pour la suite du protocole, les tests enzymatiques continueront d'être réalisés dans du tampon acétate pH 5.

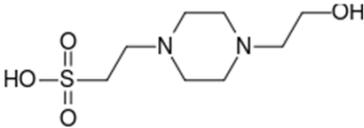
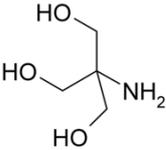
2.5 Choix de la nature du tampon d'extraction

Pour compléter les informations utiles à l'optimisation du protocole, deux constituants du tampon d'extraction ont été évalués : le Tris-HCl et l'Hepes. Le tampon d'extraction dans le processus de purification a pour but de stabiliser les protéines.

Un tampon est d'autant plus apprécié s'il remplit au mieux les conditions suivantes : résistance du pH souhaité aux dilutions et aux changements de température, peu d'effets inhibiteurs sur les processus biologiques, peu d'absorption dans le visible ou l'ultraviolet, insoluble dans les membranes et pas d'effet chélatant majeur.

L'Hepes et le Tris sont des composés organiques couramment utilisés sous forme de solution tampon en biochimie (tableau 3.2).

Tableau 3.2 : Structures chimiques de l'Hepes et du Tris

Hepes	Tris
acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	trishydroxyméthylaminométhane
$C_8H_{18}N_2O_4S$	$C_4H_{11}NO_3$
	

L'Hepes a une très bonne stabilité aux pHs physiologiques et sa dissociation dans l'eau diminue lorsque la température diminue. Son utilisation se justifie alors comme solution tampon pour maintenir la structure et la fonction d'enzymes à basses températures. Le Tris est particulièrement utilisé pour travailler avec des acides nucléiques avec un intervalle de pH 6,5 et 9,7 et est, quant à lui plus sensible à la température et à la concentration.

Les extractions avec un tampon constitué de Tris montrent une plus grande efficacité dans la production de diCQA (figure 3.16). Après 15 min de réaction enzymatique, la quantité de diCQA produit est presque doublée par rapport à des tests identiques réalisés après extraction au tampon d'extraction à base d'Hepes. Par contre, les teneurs en CQA sont identiques dans les deux conditions. Le tampon Tris-HCl permettrait une meilleure efficacité de conversion du CQA en diCQA.

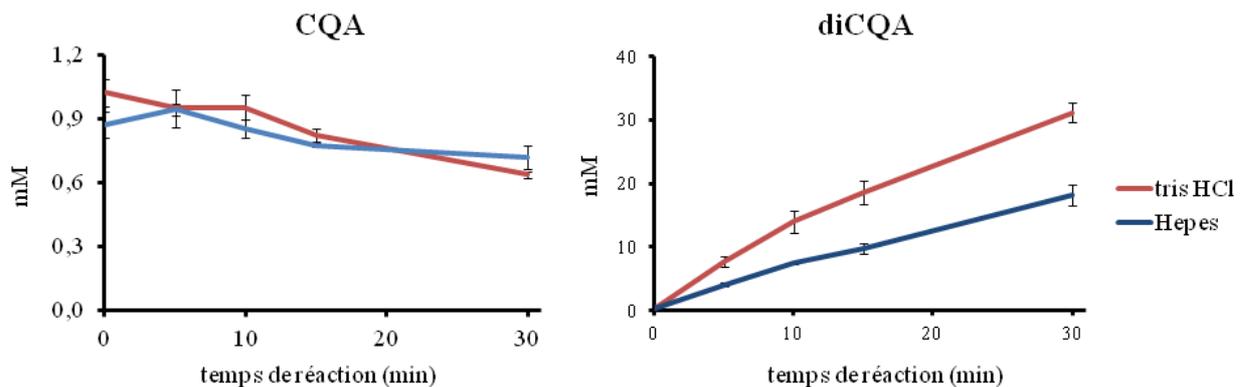


Figure 3.16 : Concentrations en CQA et diCQA (respectivement en mM et μ M) en fonction du temps de réaction enzymatique (en min) pour les deux tampons de resolubilisation après saturation au sulfate d'ammonium (40%). Hepes 50 mM pH 7,5 ou tris-HCl 50 mM pH 7,5.

Ainsi, même si le tampon Tris est réputé pour avoir une plus grande sensibilité aux variations de température et de concentration, celui-ci a été privilégié pour la suite du protocole du fait du gain constaté en activité de notre enzyme. Le culot de protéines obtenu après précipitation au sulfate d'ammonium est alors resolubilisé dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

2.6 Etape de séparation sur colonne Sephadex

La chromatographie est une technique d'analyse permettant de séparer les constituants d'un mélange. Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (liquide ou gaz) appelé phase mobile. Elles interagissent ou au contraire n'interagissent pas avec un support (ou matrice) fixe. Ce support peut être solide ou un liquide fixé que l'on appelle phase stationnaire. Il y a donc, à ce moment, une partition des composants entre ces deux types de phase. Le flux du fluide vecteur étant continu, c'est la rétention plus ou moins longue des différentes molécules sur le support fixe qui va les séparer les unes des autres.

Le principe de la chromatographie d'exclusion (appelée aussi filtration sur gel, tamisage moléculaire ou chromatographie de perméation) repose sur la masse molaire des molécules à séparer, plus exactement sur leur volume. La phase stationnaire est constituée de billes de polysaccharides gonflées dans le solvant utilisé pour l'élution. Le volume des billes est très finement calibré. Ainsi, les molécules dont le volume est supérieur à celui des billes ne peuvent pas y pénétrer et sont éluées rapidement. En revanche, les molécules dont le volume est inférieur à celui des billes y pénètrent et y subissent des frottements qui les retardent (figure 3.17).

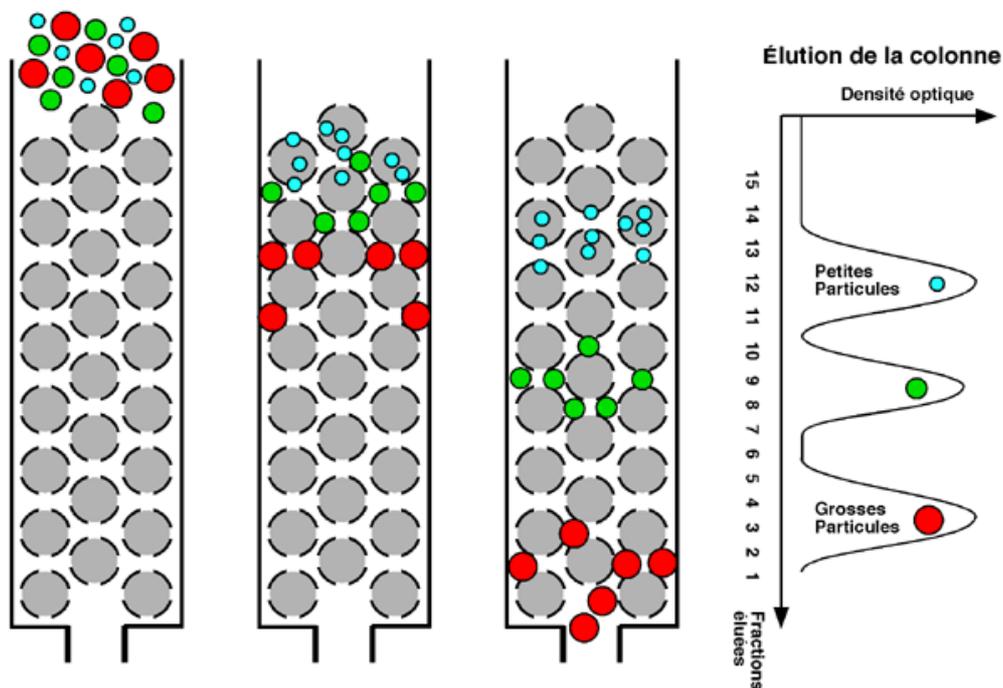


Figure 3.17 : Principe de la chromatographie par exclusion.

Dans notre cas, nous avons opté pour une phase stationnaire de type Sephadex G50 superfine qui correspond à un fractionnement efficace des protéines comprises entre 1500 et 30000 Da. En effet, on s'attend à ce que la protéine ait la taille approximative de 25 000 Da après les travaux de référence (Villegas *et al.* 1987).

2.6.1 Colonne Sephadex G50 – 22 cm

Une fois affranchi d'une partie des protéines de l'extrait brut par précipitation au sulfate d'ammonium et concentration, nous avons pu travailler une séparation plus fine sur colonne Sephadex. Tout d'abord, un premier essai a été réalisé sur une colonne de 22 cm de diamètre 1,4 cm en déposant 2 mL d'un extrait issu de la précipitation à 40 % de sulfate d'ammonium, soit 3,8 mg de protéines (tableau 3.3).

Tableau 3.3 : Fiche technique de la colonne Sephadex G50 – 22 cm et conditions d'utilisation

Sephadex G-50	
diamètre	1,4 cm
longueur	22 cm
volume	34 cm ³
débit programmé	0,4 mL.min ⁻¹
débit linéaire	16 cm.h ⁻¹
intervalle d'injection recommandé (en mL)	[0,2 ; 2]

Des fractions de 1 mL ont été collectées en sortie de colonne et l'examen du chromatogramme nous a permis de regrouper celles-ci en 5 fractions (figure 3.18 - segments représentés sous le chromatogramme). L'activité enzymatique a été mesurée dans ces 5 fractions (figure 3.19). Des activités ICS ont été détectées dans la fraction 1 et la fraction 2.

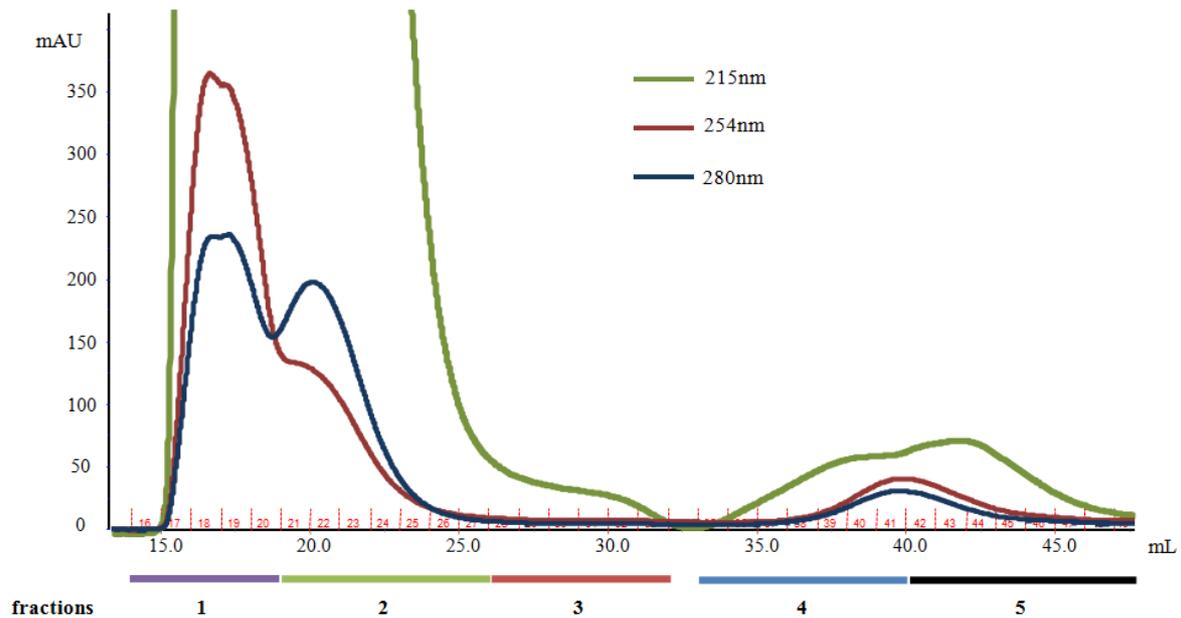


Figure 3.18 : chromatogrammes obtenus par FPLC-UV après passage d'un extrait protéique de patate douce. 3,8 mg de protéines ont été déposés sur la colonne. Pendant l'élution, des fractions de 1 mL sont récoltées (en rouge au dessus de l'axe des abscisses). Les segments colorés présentés sous les chromatogrammes représentent le regroupement de fractions effectué après examen des chromatogrammes.

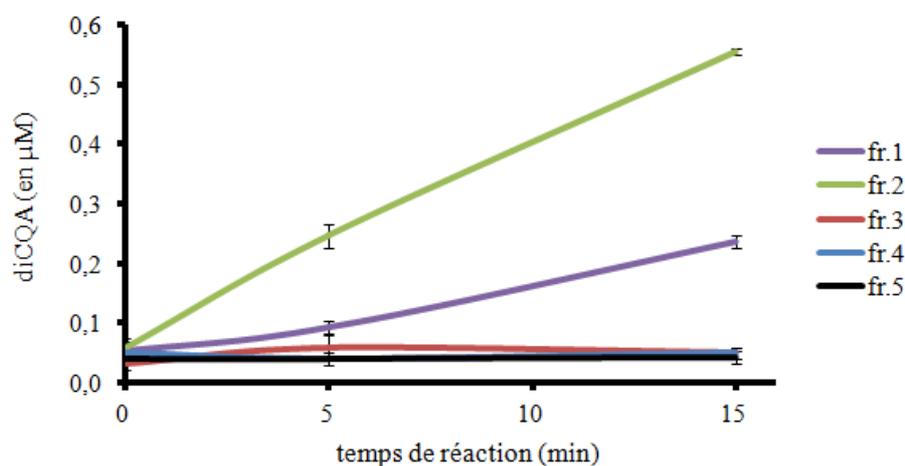


Figure 3.19 : Concentrations en diCQA (en µM) produit en fonction du temps de réaction enzymatique (en min) pour les différentes fractions isolées en sortie de colonne Sephadex G-50 décrite dans la figure 3.18.

Une grosse partie des protéines est exclue assez rapidement de la colonne et celles-ci ne sont pas correctement séparées (fractions 1 et 2). Pour la suite une colonne de longueur plus importante (92

cm) a été utilisée car notre marge de manœuvre sur la colonne de 22 cm était nulle. En effet, pour améliorer la séparation, il aurait fallu diminuer le débit. Or, celui-ci est déjà au minimum (0,4 mL.min⁻¹).

2.6.2 Colonne Sephadex G50 – 92 cm

Nous avons donc testé une colonne de la même matrice sur laquelle les échantillons migrent sur une distance de 92 cm (tableau 3.4 et figure 3.20).

Tableau 3.4 : Fiche technique de la colonne Sephadex G50 – 92 cm et conditions d'utilisation

Sephadex G-50		
diamètre	2,5 cm	
longueur	92 cm	
volume	452 cm ³	
débit programmé	1,6 mL.min ⁻¹	0,4 mL.min ⁻¹
débit linéaire	20 cm.h ⁻¹	5 cm.h ⁻¹
intervalle d'injection recommandé (en mL)	[2,3 ; 23]	

Cette dernière chromatographie est satisfaisante. En effet, elle permet de révéler deux pics distincts, bien séparés. Trois fractions sont constituées, la fraction 1 correspond au premier pic, la fraction 3 au deuxième pic et la fraction 2 à la zone intermédiaire entre les deux pics. Les pics ne sont pas complètement résolus et ne peuvent pas être intégralement compris dans une fraction de collecte. Des tests enzymatiques nous ont permis de révéler une activité de synthèse de diCQA associée au stock protéique présent dans les fractions 1 et 2 (figure 3.20 – B). Cependant, cette méthode de séparation a été affinée par des tests complémentaires de manière à mieux cibler la sortie des protéines d'intérêt. Pour cela, les fractions de 1 mL en sortie de colonne n'ont pas été réunies afin de

les utiliser séparément pour des tests enzymatiques. L'activité de l'ICS a donc pu être située plus précisément vis-à-vis du chromatogramme en sortie de colonne (figure 3.21). De plus, le débit d'élution a été diminué à $0,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

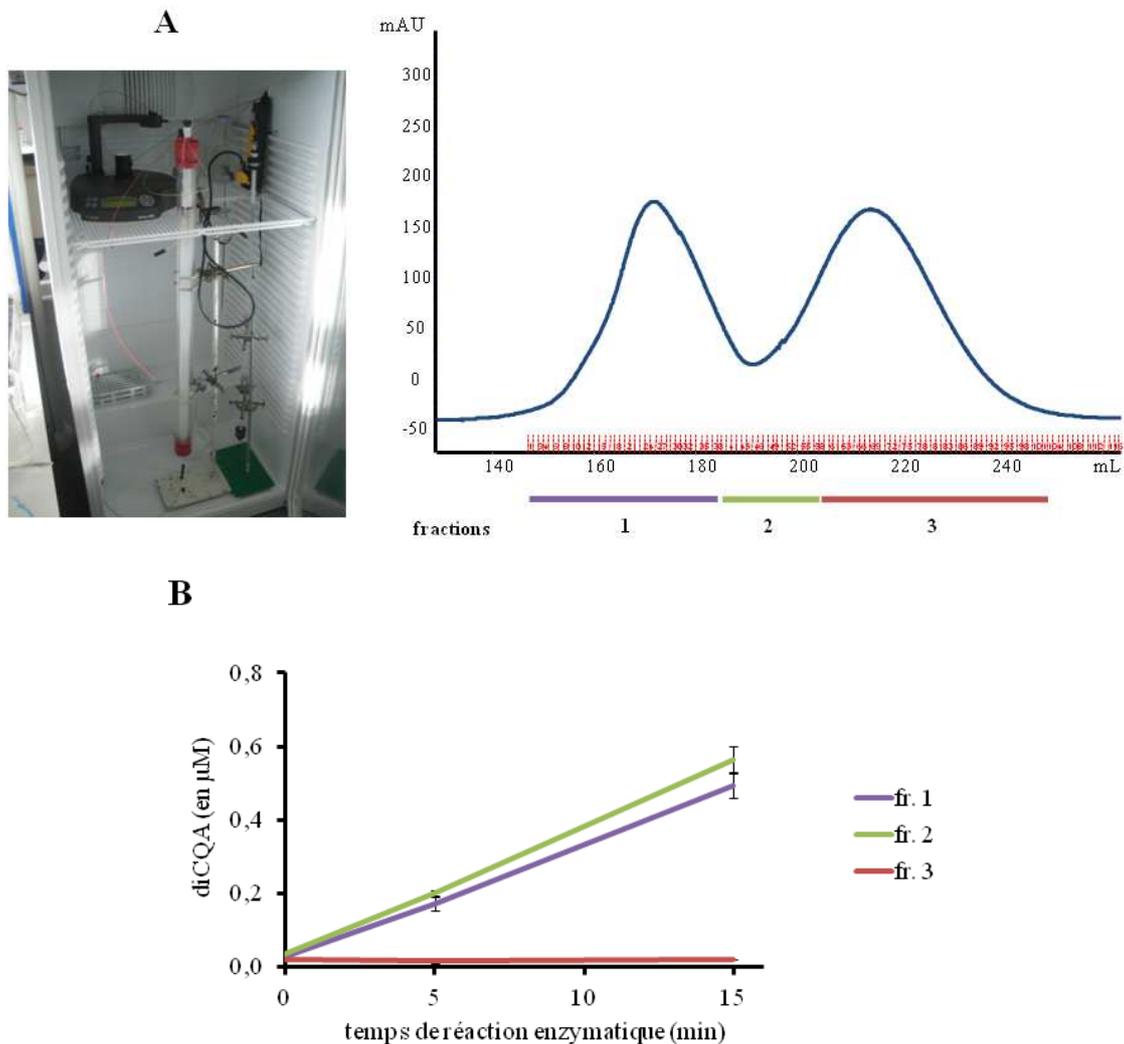


Figure 3.20 : Résultats obtenus lors de la chromatographie de l'échantillon sur une colonne Sephadex G-50 de 92 cm.

A : Chromatogramme obtenu à 280 nm par FPLC-UV en sortie de colonne Sephadex G-50 (92 cm) et mise en évidence des fractions récoltées. 38 mg de protéines ont été injectés. Pendant l'élution, des fractions de 1 mL sont récoltées (en rouge au dessus de l'axe des abscisses). Des fractions de 1 mL ont ensuite été regroupées (segments de couleur sous l'axe des abscisses).

B : Concentration en diCQA (en μM) produit en fonction du temps de réaction enzymatique (en min) pour les différentes fractions isolées en sortie de colonne Sephadex G-50 92 cm.

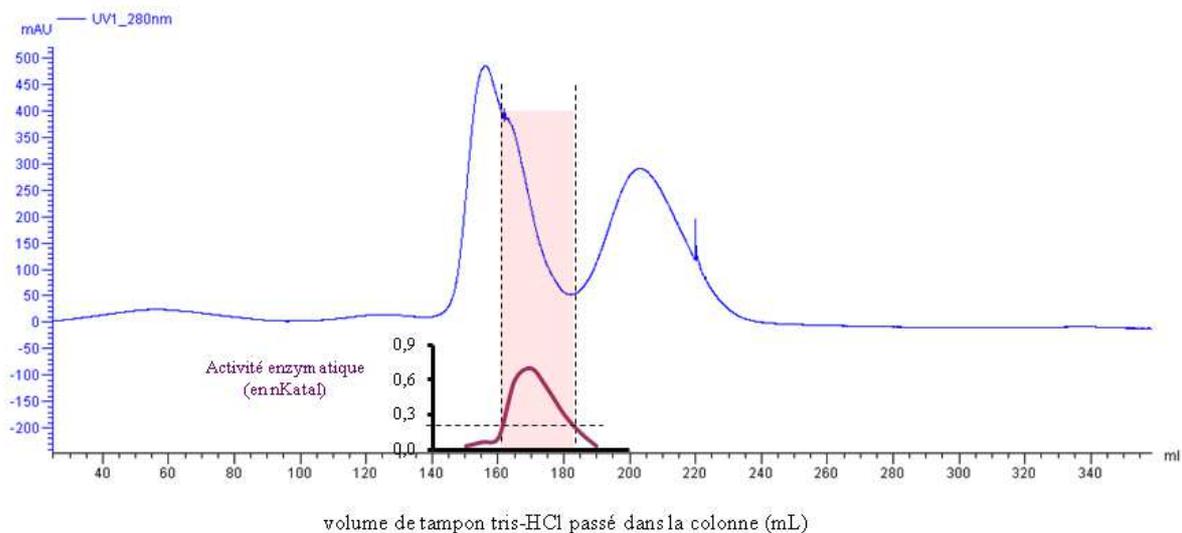


Figure 3.21 : Chromatogramme (280 nm) obtenu en sortie de colonne Sephadex G-50, 92 cm après dépôt d'un extrait protéique de patate douce (dépôt de 20 mg de protéines). Superposition d'un graphique présentant l'activité enzymatique (nKatal) des fractions en fonction du volume de tampon d'éluion tris-HCl (mL).

On remarque que l'activité synthétique recherchée est située, graphiquement, au niveau de l'entre-deux pics. On constate d'ailleurs la présence d'un épaulement à cet endroit.

Pour la suite, les fractions de la zone colorée (figure 3.21) sont alors réunies et concentrées *via* l'utilisation de colonnes « vivaspin ». C'est un système constitué d'un filtre retenant les protéines de taille supérieure à 10 kDa. Il permet donc à la fois de concentrer et de purifier légèrement les extraits.

Une fois la séparation effectuée et l'extrait concentré, celui-ci s'avère bien actif. Les résultats observables en HPLC-UV sont nets (figure 3.22 - A). La capacité de l'extrait enzymatique obtenu à produire du diCQA est significative. Plus le temps de réaction est long, plus l'intensité est importante. On peut noter l'apparition d'un autre pic produit à 6,73 min de temps de rétention (figure 3.22 - A, pic 3). Cela pourrait être du 4,5-diCQA. Les temps de rétention et les spectres correspondent (figure 3.22 - B). On peut penser que comme pour l'HCT de caféier, notre enzyme produit dans un premier temps du diCQA. Lorsqu'il est présent en quantités suffisantes, il serait ensuite isomérisé en 4,5-diCQA (Lallemand *et al.*, 2012).

Cette étape de séparation par gel filtration est satisfaisante. Elle permet de s'affranchir d'une partie des protéines, de dessaler notre extrait et grâce aux colonnes vivaspin de le concentrer. Nous avons

donc pu envisager par la suite une nouvelle étape de purification avec la technique de chromatographie d'échange d'ions.

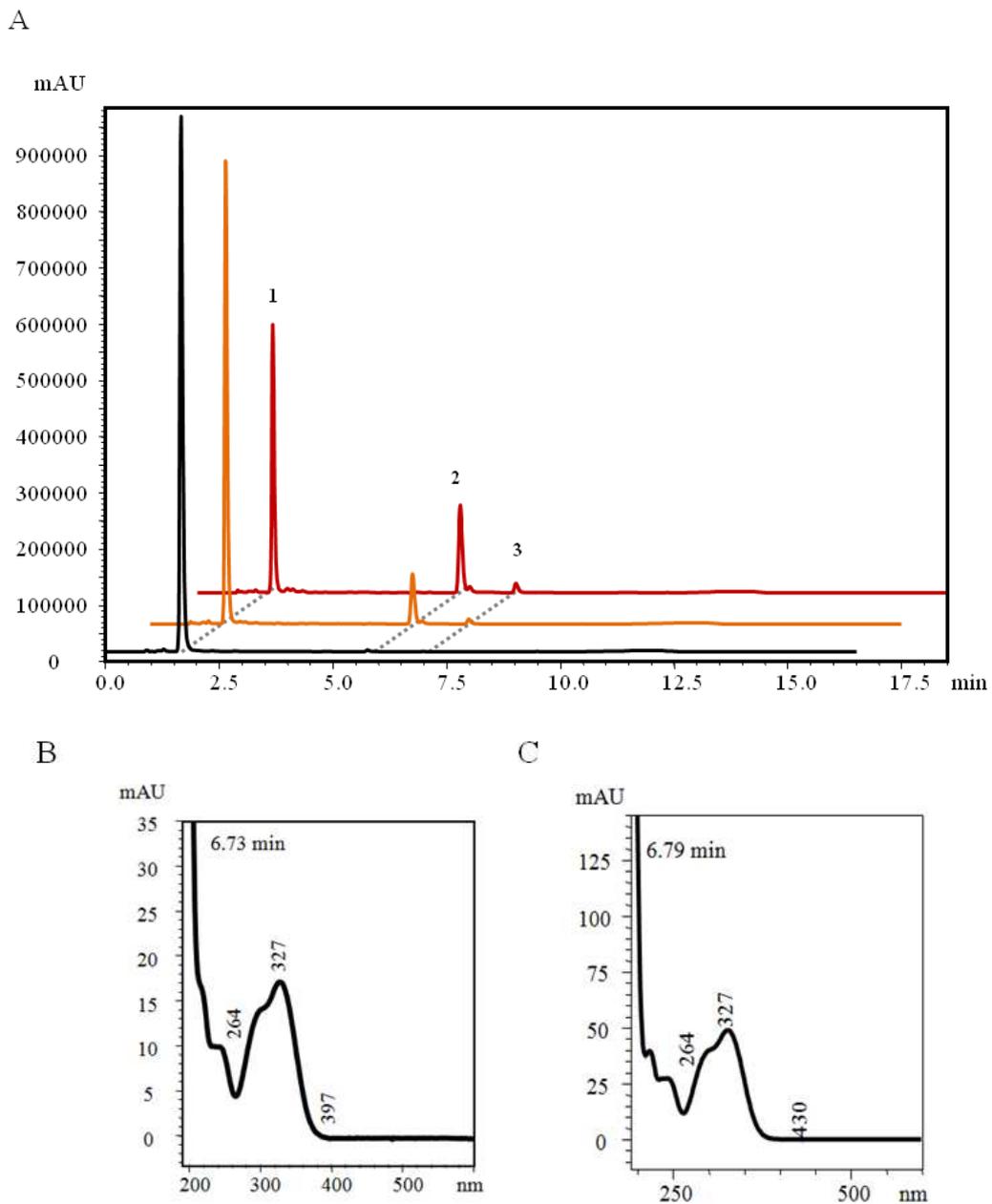


Figure 3.22 : Tests enzymatiques en présence de CQA réalisés à partir d'une fraction protéique concentrée issue de la séparation sur colonne Sephadex G50 – 92 cm.

Le mélange réactionnel contient 1 mM de CQA et les réactions sont réalisées à 30 °C

- Chromatogrammes obtenus par HPLC-UV après passage des milieux réactionnels. Noir : 0 min de réaction, orange : 5 min, rouge : 15 min. Pic 1 = CQA, pic 2 = diCQA, pic 3 = 4,5-diCQA (?)
- Spectre d'absorption du pic 3.
- Spectre d'absorption du 4,5-diCQA (standard).

2.7 Séparation par échange d'ions

A partir de l'extrait concentré issu de la gel-filtration, nous avons pu ajouter une étape de séparation sur colonne échangeuse d'ions (anionique) au protocole. Les échangeurs d'ions sont des billes qui portent des groupements ionisables (figure 3.24).

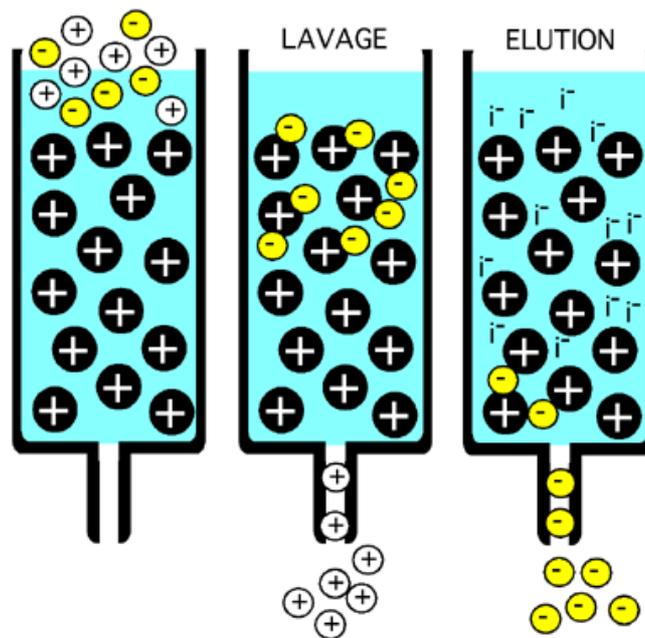


Figure 3.24 : Principe de chromatographie par échange d'ions.

Dans un premier temps, la résine est équilibrée dans un tampon dont le pH est tel que le groupement porté par l'échangeur d'ions soit ionisé :

- dans le cas d'une base (échangeur d'anions), le pH doit être inférieur au pKa du groupement ionisable
- dans le cas d'un acide (échangeur de cations), le pH doit être supérieur au pKa du groupement ionisable

Les molécules à séparer sont dans le même tampon (donc au même pH) et en fonction de leur point isoélectrique, elle porte une charge nette. Il y a deux manières d'éluer les molécules fixées sur la résine :

- en modifiant le pH de la phase mobile de telle sorte que les molécules qui sont chargées ne le soient plus (ou qu'elles portent une charge de même signe que l'échangeur d'ions). Il n'y a

alors plus d'interaction électrostatique entre les molécules et le groupement chargé porté par la résine et les molécules sont éluées.

- en ajoutant un sel (à une concentration croissante) qui apporte forcément un ion de même charge que les molécules fixées à la résine : cet ion s'appelle un contre-ion.

La récupération des protéines éluées de la colonne est réalisée, comme pour l'étape de gel filtration, à l'aide d'un collecteur de fractions.

Pour continuer notre progression dans le protocole de purification, nous avons utilisé une colonne Sepharose DEAE fast flow. Cette colonne est une échangeuse d'anions, elle est constituée de diéthylaminoéthanol (DEAE) lié au Sepharose (polymère de polysaccharides), en faisant une résine chargée positivement. La migration d'un échantillon dans cette résine permet alors une séparation spécifique des molécules chargées négativement. L'éluion est effectuée avec un tampon Tris-HCl plus ou moins chargé en NaCl. L'ion Cl^- fait office de contre-ion.

La séparation par échange d'ions nécessite une mise au point en deux étapes (figure 3.25).

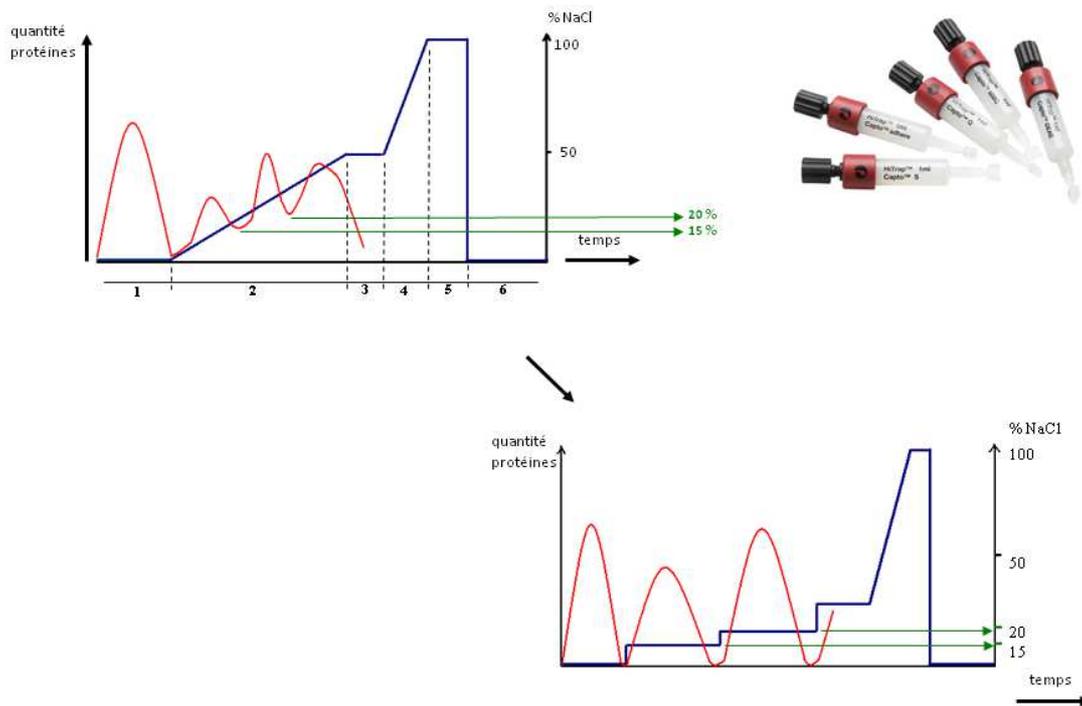


Figure 3.25 : Schéma explicatif pour la mise au point d'une méthode de séparation des protéines sur colonne échangeuse d'ions

La première consiste à éluer les protéines fixées sur la colonne avec un gradient linéaire de NaCl. Cette méthode comporte dans un premier temps un plateau d'éluion au tampon Tris-HCl sans NaCl,

afin d'éluer toutes les protéines qui ne s'accrochent pas à la colonne. A partir du moment où le pic est « complètement formé » (quantité de protéines éluées redescendue au niveau 0), la concentration en NaCl du tampon est progressivement augmentée et permet une élution graduelle des protéines en fonction de leur capacité d'accrochage. La concentration en NaCl atteint une valeur de 0,5 M, la quantité de tampon utilisée lors de ce gradient d'élution représente 3 à 4 volumes de colonne. Une fois la concentration maximale en NaCl atteinte, on estime que quasiment toutes les protéines sont décrochées. Néanmoins, un plateau d'élution toujours à 0,5 M de NaCl dans le tampon Tris est réalisé pour s'en assurer. Enfin, une hausse de la concentration pour atteindre 1 M de NaCl est effectuée avec un plateau à cette concentration, dans le but de nettoyer la colonne. Puis, celle-ci est rééquilibrée à une concentration nulle en NaCl.

La deuxième étape consiste à s'appuyer sur ce premier résultat de migration pour affiner la méthode en découpant le gradient et en y insérant des plateaux de concentrations en sels. Ces plateaux permettent de séparer les pics de protéines éluées. En parallèle les fractions sont récupérées pour la réalisation de tests enzymatiques, afin de cibler l'activité de l'ICS.

L'application de cette méthode a donné un résultat concluant résultant en une bonne séparation de pics de protéines éluées (figure 3.26).

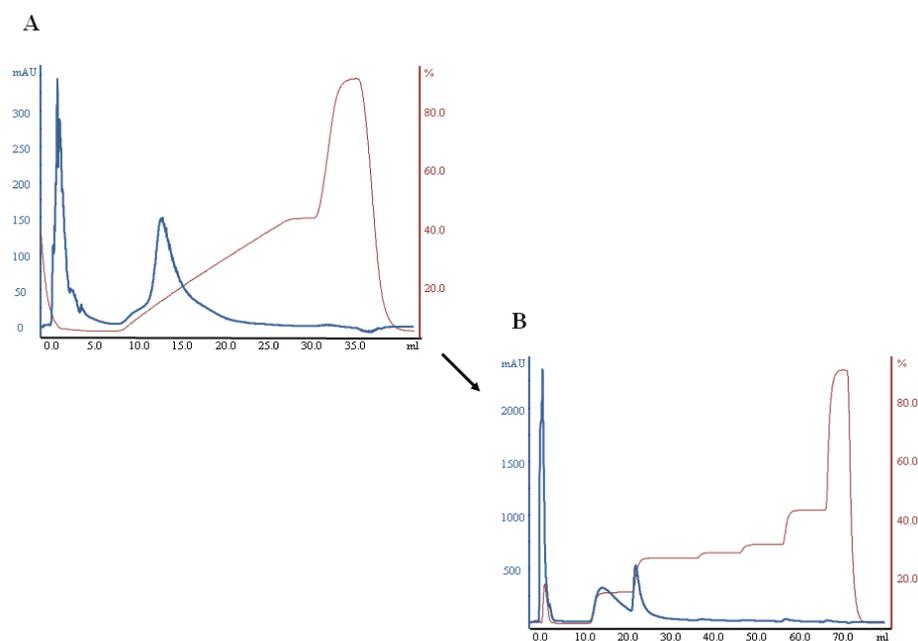


Figure 3.26 : Chromatogrammes (en bleu) obtenus par FPLC-UV avant (A) et après (B) optimisation du protocole pour l'élution des protéines injectées sur la colonne Sepharose DEAE. Le gradient de NaCl est représenté en rouge (% de NaCl).

Ainsi, le résultat des tests enzymatiques réalisés sur les fractions de 1 mL isolées après élution des protéines nous a permis de cibler précisément le moment de la sortie de notre protéine d'intérêt. L'activité de l'ICS est notamment retrouvée très spécifiquement dans le deuxième pic, correspondant au deuxième palier d'élution (figure 3.27).

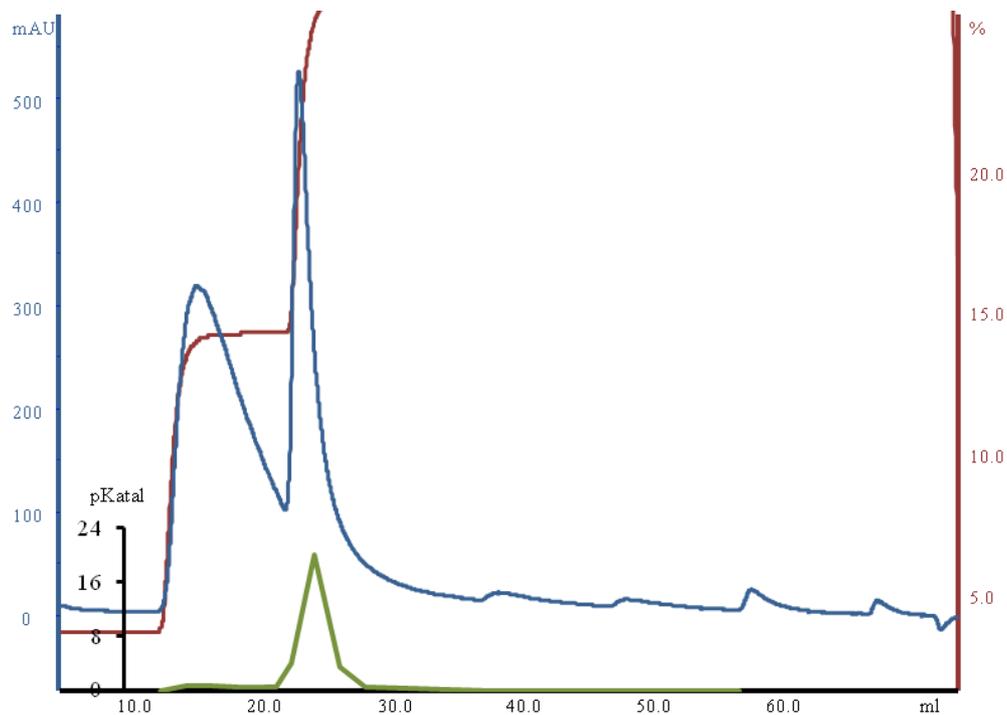


Figure 3.27 : Absorbance à 280 nm obtenue en sortie de colonne Sepharose G-50, 92 cm après injection d'un extrait protéique de patate douce (bleu).

17 mg de protéines ont été injectés. Le gradient de NaCl (en %) est représenté en rouge. Les résultats de mesure de l'activité enzymatique (pKatal, en vert) des fractions en fonction du volume de tampon d'élution tris-HCl + NaCl (mL) sont superposés au profil chromatographique.

Le résultat est très satisfaisant car la séparation est bonne et la représentation de l'activité enzymatique est liée à un pic distinct ayant une bonne résolution. Un ajustement, consistant à étendre le plateau de NaCl du premier pic, permet cependant d'augmenter la discrimination de ce pic (figure 3.28).

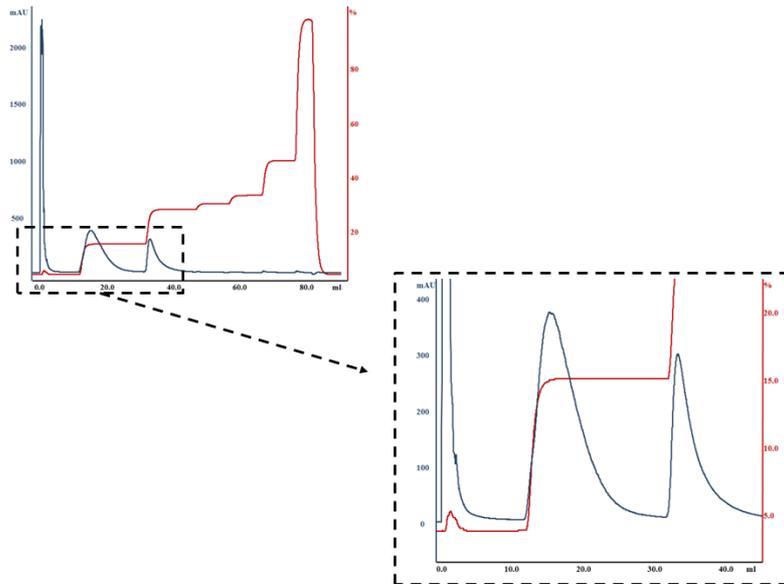


Figure 3.28 : Chromatogrammes obtenus par FPLC-UV après optimisation du protocole d'éluion des protéines injectées sur la colonne Sepharose DEAE – allongement du temps d'éluion à 15 % de NaCl

A ce stade de purification, nous avons obtenu un extrait protéique simplifié. Cependant, il ne s'agit pas encore d'une protéine pure, comme nous pouvons le voir sur le gel SDS (figure 3.29).

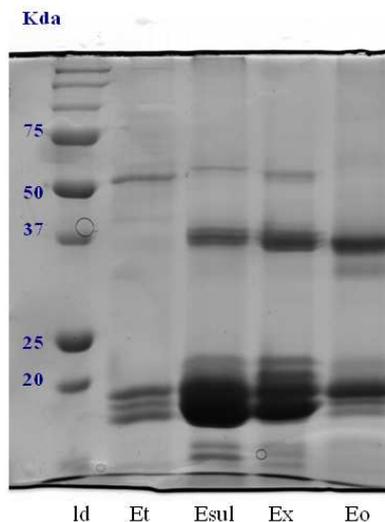


Figure 3.29 : Gel SDS-PAGE 12,5% d'acrylamide sur lequel sont déposées les différentes fractions isolées au cours du protocole de purification de l'ICS. Dans chaque cas, 5 µg de protéines sont déposés. Id : échelle de taille, Et : extrait total avant précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Esul : extrait obtenu après précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40%), Ex : extrait obtenu après passage sur colonne Sephadex et concentré, Eo : extrait obtenu après passage sur colonne Sepharose et concentré.

2.8 Bilan du protocole de purification

A ce stade, le protocole de purification de l'ICS chez la patate douce comprend 8 étapes importantes (figure 3.30). Dans un premier temps, la voie métabolique de la synthèse du diCQA doit être particulièrement induite. Ceci est effectif par une incubation de disques de tubercules de patate douce sur du papier filtre imbibé d'eau ultra-pure dans l'obscurité à 25 °C pendant 48 h. S'ensuit une étape dite de broyage à l'acétone qui permet d'éliminer les molécules qui pourraient gêner la purification pour la suite. A partir de la poudre obtenue, il est alors possible d'extraire les protéines à l'aide d'un tampon d'extraction. Une précipitation des protéines à 40 % de saturation de solution en sulfate d'ammonium nous permet d'éliminer une bonne part de protéines et de concentrer l'extrait, 66 % des protéines sont ainsi éliminées. Puis, les protéines restantes sont séparées en fonction de leur masse, puis de leur charge, l'extrait est à chaque fin d'éluion, de nouveau concentré.

	Etape de purification	Conditions expérimentales	intérêts
1	Incubation de disques	eau ultra pure, 25°C, obscurité, 48h	Induction de la production en CQA et diCQA
2	Broyage acétone	acétone et matériel froids (~-20°C)	Elimination grosses molécules, colorants (caroténoïdes...)
3	Extraction	tampon d'extraction PVPP 10%	Extraction des protéines de la poudre d'acétone
4	Précipitation au sulfate d'ammonium	saturation de l'extrait enzymatique à 40% de sulfate d'ammonium	Elimination de protéines selon leur solubilité + concentration
5	Filtration sur Sephadex	Sephadex G50 - 92cm - d. 2.5cm	Séparation selon la taille des protéines
6	Centrifugation et filtration	Vivaspin 10kDa	Concentration et élimination des protéines < 10kDa
7	Séparation sur Sepharose	Sepharose DEAE (anionique), décrochage au tampon tris + NaCl	Séparation selon la charge des protéines
8	Centrifugation et filtration	Vivaspin 10kDa	Concentration

Figure 3.30 : Bilan du protocole de purification de l'ICS à partir de patate douce.

L'enzyme a été extraite à partir de 200 g de disques racinaires de patate douce qui ont été incubés pendant 2 jours à 25 °C à l'obscurité sur du papier filtre humidifié.

3 Identification sur gel

Les échantillons issus du protocole de purification décrit ci-avant ne sont pas encore assez purs pour compter pousser les investigations vers des techniques de séquençage.

La fraction concentrée issue du passage sur colonne Sephadex et celle issue du passage sur colonne échangeuse d'ions, ont été déposées sur gel d'acrylamide 12,5 % afin d'avoir une idée de la complexité des échantillons. Avant coloration, une partie du gel a été utilisée pour la réalisation de tests enzymatiques en présence de CQA. Cette portion de gel a été découpée en bandelettes de 1 cm de hauteur sur 0,5 cm de largeur (figure 3.31 – A). Huit bandes regroupent alors l'ensemble des protéines déposées pour chaque fraction (5 µg) et chacune d'elle a été préalablement réduite en morceaux plus petits et ceux-ci ont été incubés en présence de 1 mM de CQA (figure 3.31 - B). L'autre partie du gel, dont le dépôt est identique, a été colorée classiquement au bleu de coomassie. Les gels SDS sont soumis à des bains de triton (2 %) avant découpage et réalisation de tests enzymatiques. En effet, le SDS a une action inhibitrice sur l'activité de notre enzyme.

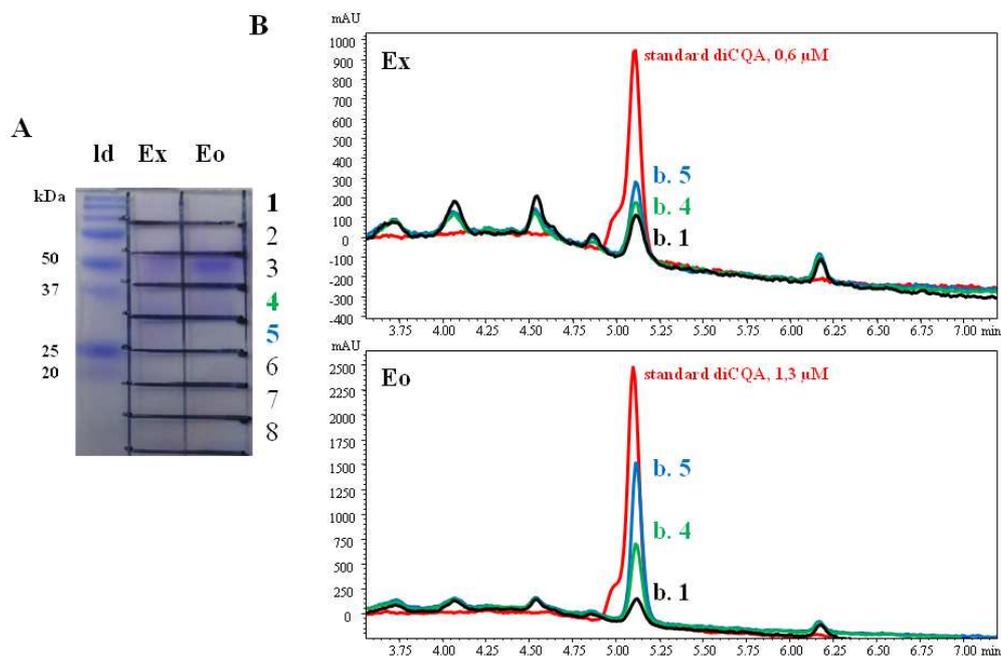


Figure 3.31 : Tests enzymatiques sur fragments de gel SDS PAGE

- Gel SDS avec Ex (fraction récupérée en sortie de colonne Sephadex et concentrée) et Eo (fraction récupérée en sortie de colonne Sepharose et concentrée) – gel 12,5 % d'acrylamide et dépôt de 5 µg de protéines pour chacune des fractions, tampon de charge sans agent réducteur.
- Chromatogrammes obtenus par HPLC-UV des tests enzymatiques réalisés à partir des fragments de gel.

On remarque que l'incubation de certaines bandes permet une production en diCQA. Un pic résiduel est malgré tout présent quelque soit la bande incubée, mais il reste de faible intensité et on le considère comme faisant partie du bruit de fond. La plus forte teneur en diCQA est obtenue après incubation de la bande 5, et de façon plus marquée pour l'extrait Eo. Après incubation pendant 18 h de la bande 5 de l'extrait Eo, 0,08 nmol de diCQA est produit en 18 h et 0,03 nmol pour la bande 5 de l'extrait Ex. Cela confirme un état plus avancé de l'extrait Eo dans le protocole de purification permettant une meilleure activité de notre enzyme. Ce constat de la capacité de notre enzyme de conserver son intégrité fonctionnelle après dépôt sur gel SDS apporte de nombreuses perspectives. En effet, nous pouvons déjà noter que cette enzyme est robuste et conserve son intégrité malgré de nombreuses manipulations. Nous avons, d'ailleurs, pu tester plusieurs agents réducteurs (DTT et β -mercaptoéthanol) afin d'étudier leur impact sur la capacité de notre enzyme à produire le diCQA. En effet, de tels produits chimiques par leur capacité à rompre les ponts dissulfures peuvent fragiliser la structure tertiaire des protéines et donc affecter leur activité enzymatique. Or, il s'avère que l'utilisation d'agents réducteurs n'affecte en rien l'activité de l'ICS. On peut même constater que son activité en est meilleure après découpe des portions de gel et incubation (figure 3.32). En effet, sans utilisation d'agent réducteur, il est possible, en 18 h, de produire 1,9 nmol de diCQA (résultat cumulé de chaque bande) et avec l'ajout de β -mercaptoéthanol dans le tampon de charge, 4,2 nmol de diCQA sont produits en cumulé. Ceci a été réalisé en déposant une même quantité de protéines. Cela peut s'expliquer par le fait que l'utilisation d'agents réducteurs permet de réduire les risques d'oxydation des protéines.

Ces résultats sur gel SDS nous ont permis d'estimer la taille de la protéine par calcul logarithmique, celle-ci serait de l'ordre de 30 kDa. Nous nous attendions à environ 25 kDa (Villegas *et al.*, 1987).

L'expérience a été menée également sur gel d'isoélectrofocalisation. De la même manière, 25 μ g de protéines issues de la séparation sur colonne Sepharose ont été déposés sur un gel de séparation selon la charge de la protéine. Le tracé de migration a ensuite été divisé en fragments utilisés par la suite pour la réalisation de tests enzymatiques par incubation en présence de diCQA. Le résultat est moins flagrant que pour les gels SDS, malgré tout, on perçoit une activité plus importante pour certaines bandes, se distinguant du bruit de fond (figure 3.33). Une technique différente a été utilisée cette fois pour la réalisation de tests enzymatiques. La bande n'a pas été incluse directement dans le milieu d'incubation, mais elle a été broyée avec du sable de Fontainebleau. Le broyat a ensuite été repris dans du tampon Tris-HCl pH 7 et filtré. Pour la bande 3, notamment, on quantifie environ 0.025 nmol de diCQA formé (sans prendre en compte la différence de bruit de fond).

Nous pouvons voir à travers ces résultats de quantifications que l'ICS se situe au niveau de pl compris entre 3,6 et 5,1 approximativement. Cela concorde avec le pl attendu de 4,6 (Villegas *et al.*, 1987).

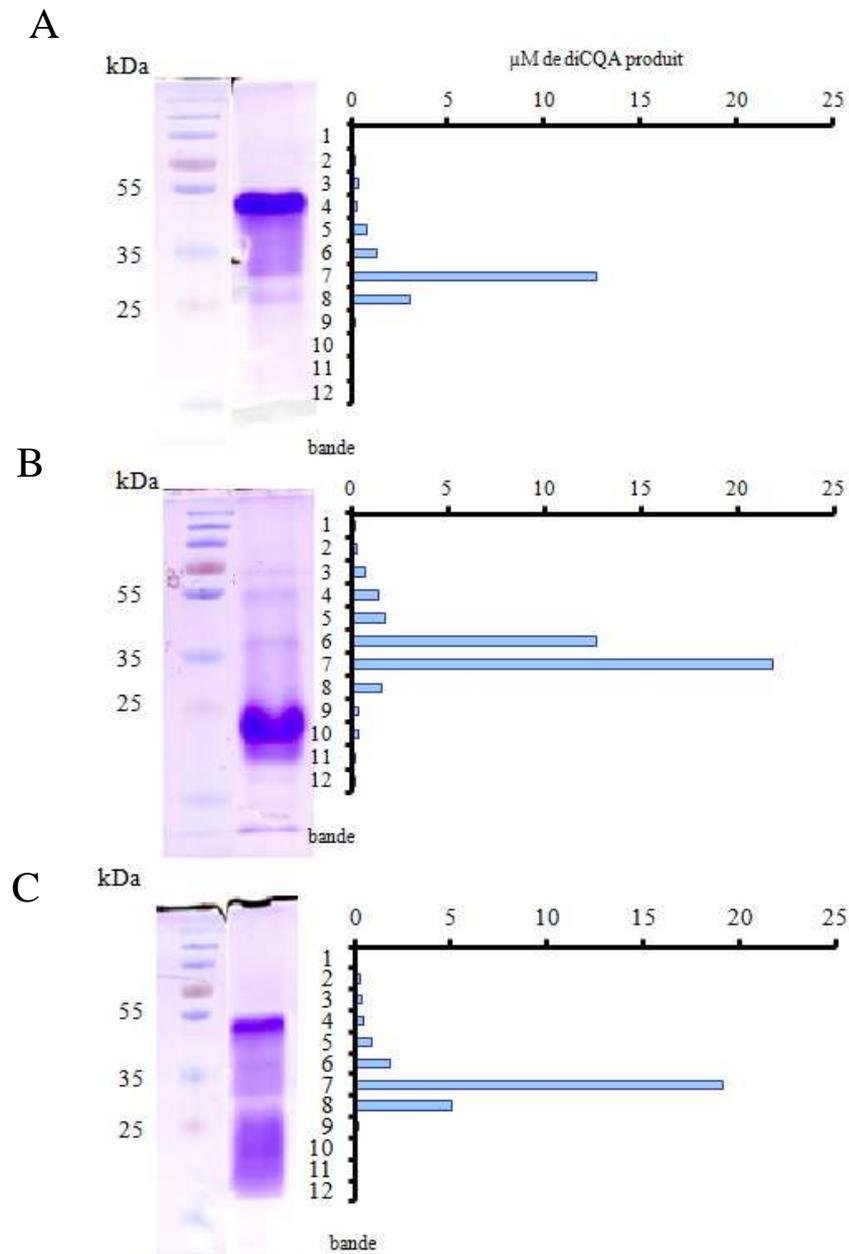


Figure 3.32 : Tests enzymatiques sur fragments de gel SDS PAGE - gel 12,5 % d'acrylamide, dépôt de 15 μg de protéines de la fraction Eo (issue de la séparation sur Sepharose DEAE) et quantifications en diCQA produit (μM) en fonction de la bande incubée. Volume réactionnel = 100 μL.

- A. Sans utilisation d'agent réducteur
- B. Ajout de β-mercaptoéthanol (5 %) dans le tampon de charge
- C. Ajout de DTT (100 mM) dans le tampon de charge

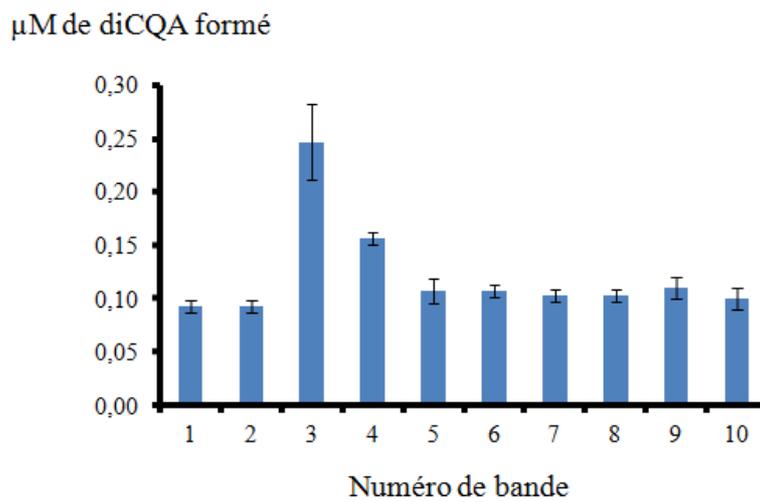
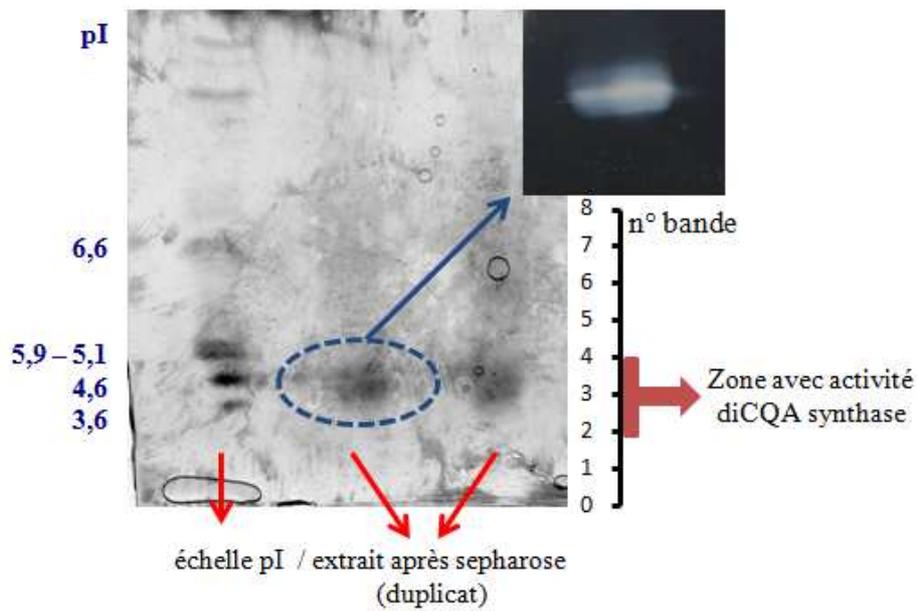


Figure 3.33 : Tests enzymatiques sur fragments de gel IEF - 25 μg de protéines de la fraction Eo (issue de la séparation sur Sepharose DEAE) ont été déposés et le diCQA produit (μM) a été quantifié en fonction de la bande incubée. Le volume réactionnel est de 100 μL, les incubations ont été réalisées pendant 15 min à 30 °C.

4 Séquençage des protéines

A l'issue de la localisation de l'ICS sur gel SDS, quatre fragments ont été envoyés à séquencer (figure 3.34). Les bandes 3 – 4 – 5 et 6 ont été étudiées. Les protéines contenues dans les bandes de gel ont subi une digestion à la trypsine et ont été analysées par ESI LC-MS/MS. En parallèle, à partir d'une banque d'ESTs de patate douce constituée à partir de données publiques, des uniséquences ont été assemblées et traduites dans les 6 cadres de lecture possibles. Ensuite, les séquences avec un cadre de lecture supérieur à 100 acides aminés ont été sélectionnées. Enfin, ces séquences ont été triées pour constituer notre banque comparative de référence.

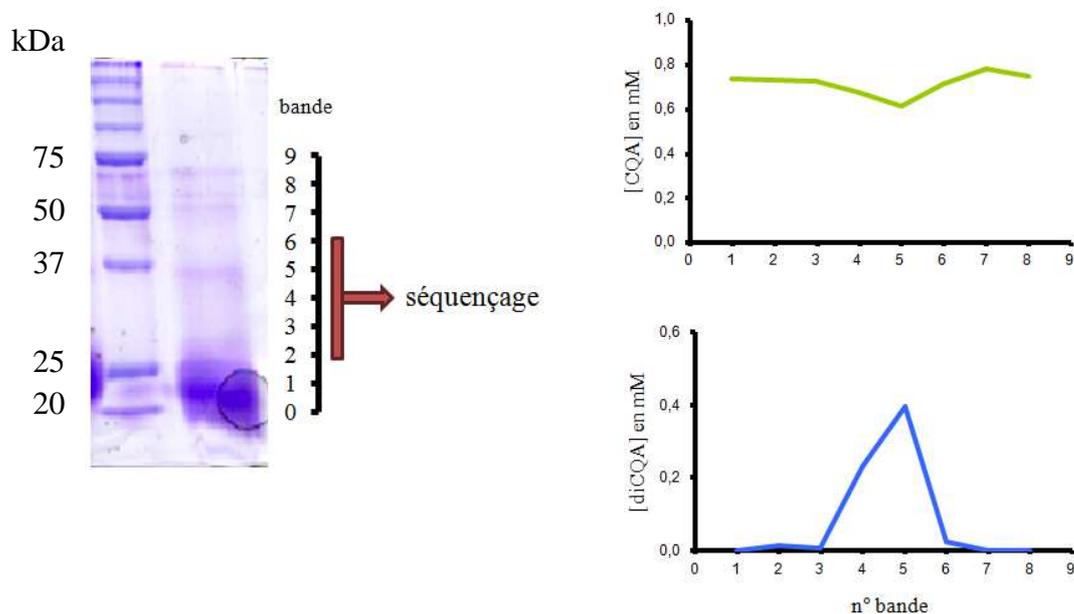


Figure 3.34 : Tests enzymatiques sur fragments de gel SDS et mise en évidence des bandes envoyées au séquençage - dépôt de 15 µg de protéines de la fraction Eo (issue de la séparation sur Sepharose DEAE) et quantifications en CQA et diCQA produits (mM) en fonction de la bande incubée.

Ainsi, les résultats du séquençage ont pu être confrontés à cette base de données. Cette confrontation a permis l'identification de 64 séquences. Après une étude approfondie des séquences (blasts, étude des motifs caractéristiques...), l'une d'elle a attiré notre attention. Il s'agit d'une séquence qui présente les motifs caractéristiques de la superfamille des SGNH hydrolases et qui est très proche d'un point de vue de la séquence nucléotidique d'une GDSL esterase / lipase de tomate, la chlorogénate : glucarate caféoyltransférase SICGT (64 % de similitude, e-value 3.10^{-107} predicted GDSL esterase / lipase At1g28610-like – *Solanum lycopersicon*). Cette dernière catalyse la formation

de caféoylglucarate et caféoylgalactarate en utilisant le CQA comme donneur d'acyle (Teutschbein *et al.*, 2010). La SICGT a été le premier exemple mis en évidence de protéine GDSL lipase-like qui a perdu son activité hydrolytique au profit d'une nouvelle fonction dans le métabolisme des végétaux, à savoir une fonction d'acyltransférase intervenant dans la synthèse d'esters d'acides hydroxycinnamiques (Teutschbein *et al.*, 2010). Avant la découverte de cette protéine, le seul exemple connu d'enzyme utilisant le CQA comme donneur d'acyle était l'ICS impliquée dans la synthèse de diCQA (Villegas *et al.*, 1987).

La protéine mise en évidence par le séquençage d'extrait de patate douce se caractérise par un point isoélectrique de 4,63 et une masse moléculaire de 28 kDa, ce qui correspond relativement bien aux données de Villegas.

5 Etude de la séquence potentielle de l'ICS chez la chicorée

5.1 Analyse des séquences

Dans un premier temps, la séquence obtenue chez la patate douce a été confrontée aux données génomiques de chicorée disponibles au laboratoire. Les données transcriptomiques obtenues à la suite de l'élicitation de cultures cellulaires de racines (voir publication chapitre 2) ont par la même occasion été de nouveau exploitées. Pour rappel, les ARNs des cultures cellulaires ont été identifiés et quantifiés dans 3 conditions : une condition témoin sans élicitation, une condition d'élicitation au MeJA (50 μ M) et une condition d'élicitation à l'éthanol. La séquence obtenue a donc été soumise pour comparaison aux bases de données génomiques de chicorée disponibles au laboratoire ainsi qu'aux résultats de l'analyse transcriptomique. Le crible a été réalisé en tenant compte de deux critères : l'homologie de séquence avec la protéine identifiée chez la patate douce et la réponse à l'induction au MeJA sur cultures cellulaires. Les analyses révèlent deux contigs avec un fort taux de similitude par rapport à la séquence candidate de patate douce. Le premier correspond à une protéine de 41 kDa (lipase 1) et le deuxième à une protéine de 34 kDa (lipase 2). Ils sont tous les deux induits par le méthyljasmonate (quantité de transcrits x5 pour la première séquence et x6 pour la deuxième par rapport au témoin éthanol) (figure 3.36 - A). Ceci est cohérent avec les résultats obtenus précédemment stipulant que le MeJA est un inducteur de la voie de biosynthèse des acides chlorogéniques.

Les séquences nucléotidiques de ces deux lipases sont identiques mais de tailles différentes. Il s'agit de deux prédictions différentes de la structure d'une même région génomique. Ces deux modèles sont confortés par les données transcriptomiques. La lipase 1 comporte 8207 pb et 5 exons alors que la lipase 2 est constituée de 3246 pb et de seulement 4 exons (figure 3.36 – B). Le premier exon de la lipase 2 équivaut à l'exon 2 de la lipase 1, mais il comporte des bases supplémentaires présentes dans l'intron situé en amont de l'exon de la lipase 1. Le codon initiateur ATG de la lipase 2 est présent dans cette zone nucléotidique. A ce stade, nous ne savons pas si la lipase 2 est présente naturellement et est active à cette taille. La comparaison de la séquence identifiée chez la patate douce avec les bases de données végétales disponibles sur internet donne en résultats des enzymes de taille moyenne de l'ordre de 40 kDa. Les résultats obtenus nécessitent donc encore quelques efforts d'investigations.

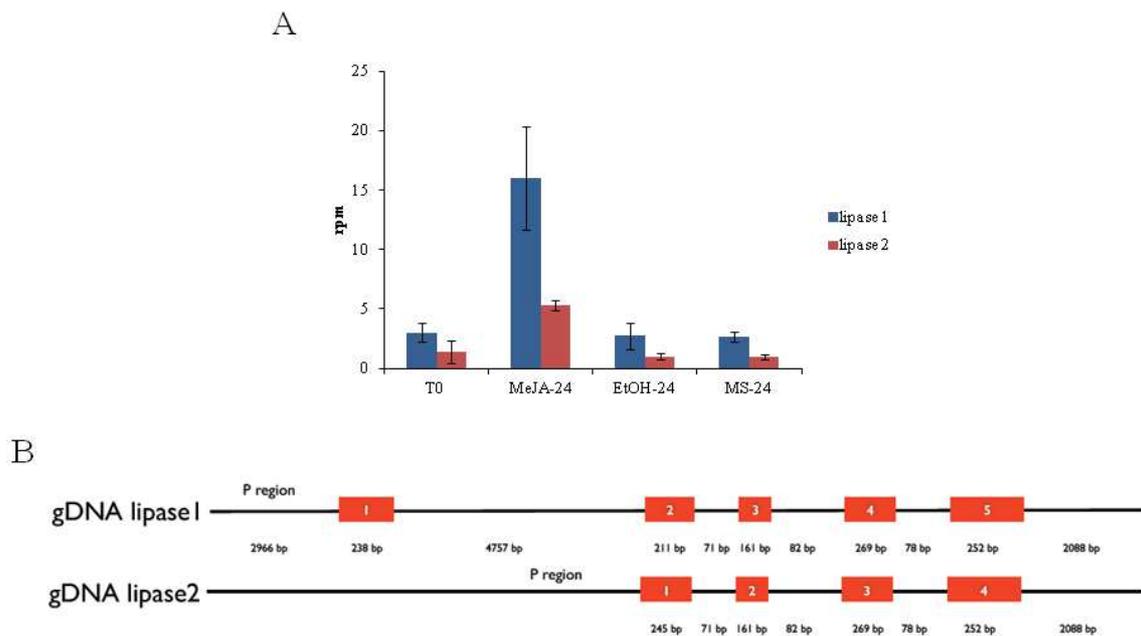


Figure 3.36 : (A) Expression génique des lipases 1 et 2 (rpm – reads per million) de cultures cellulaires de racines de chicorée dans 3 conditions : témoin avant élicitation (T0), élicitation 24 h au MeJA (MeJA-24), élicitation 24 h à l'éthanol (EtOH-24), témoin après 24 h sans élicitation (MS-24)

(B) Organisation génomique des deux séquences identifiées chez la chicorée et proche de celle mise en évidence chez la patate douce. Le P symbolise la séquence promotrice.

L'analyse de la séquence ORF de la lipase 1 par le programme targetP a permis de mettre en évidence la présence d'un peptide signal de 27 acides aminés adressant la protéine vers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi afin d'être sécrétées hors de la cellule (figure 3.37). La séquence de la lipase présente également le motif catalytique sérine caractéristique des GDSL lipases. La sérine joue un rôle important en tant qu'acide nucléophile dans l'activité hydrolytique de la lipase (Akoh *et al.*, 2004). Ces deux séquences, peptides signal et motif catalytique sérine, sont positionnées près de la région N-terminale de la protéine. En ce qui concerne la lipase 2, de plus petite taille, elle ne possède pas ces deux régions. On peut alors penser que cela est suffisant pour induire une toute autre fonction à deux enzymes très proches.

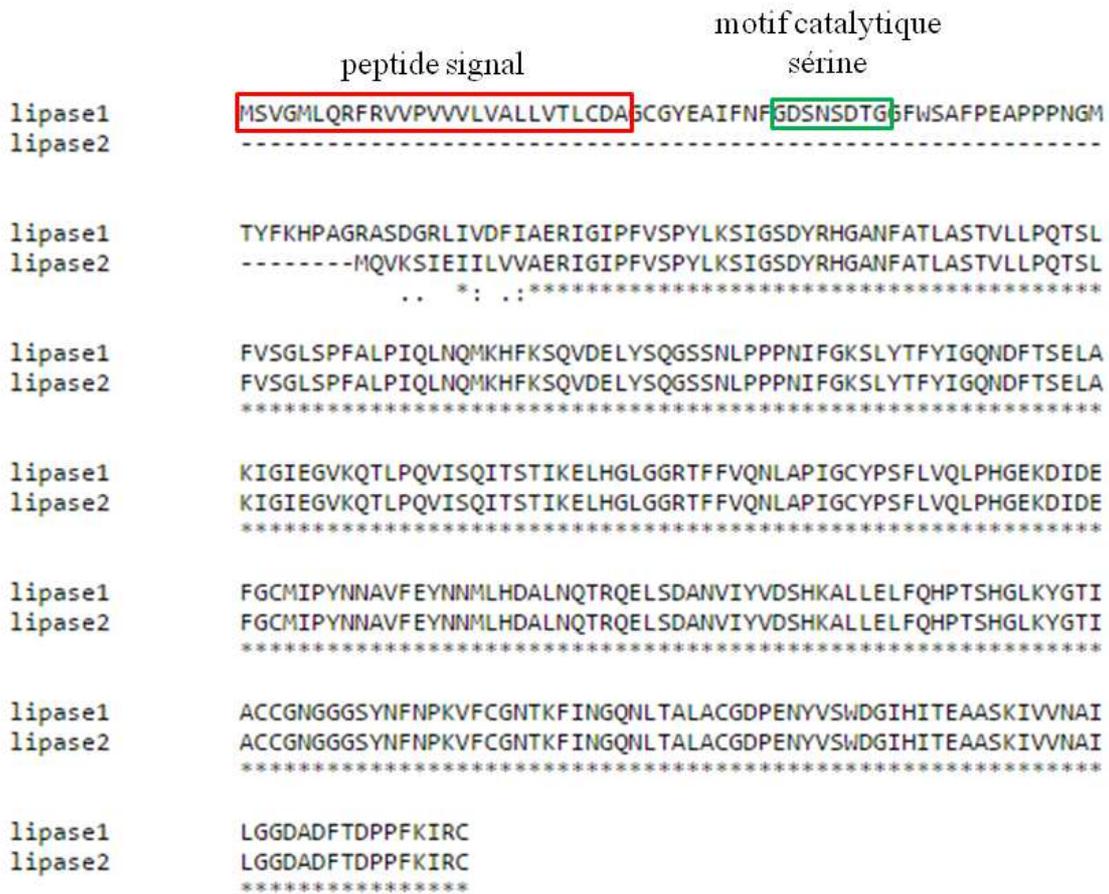


Figure 3.37 : Alignement des séquences en acides aminés des lipases 1 et 2 et mise en évidence du peptide signal et du motif catalytique sérine dans la séquence de la lipase 1.

5.2 Action du PMSF sur l'ICS

Des expérimentations ont été menées dans le but d'étayer la possibilité de l'existence d'une enzyme de la famille des GDSL esterase / lipases dotée d'une activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase à partir de données de la littérature. Les enzymes de la famille des GDSL sont réputées être sensibles au PMSF (Teutschbein *et al.*, 2010). Nous avons alors voulu juger de l'effet du PMSF sur la capacité de synthèse de diCQA de notre extrait (figure 3.38). Le PMSF est solubilisé dans l'isopropanol. Un premier extrait protéique a donc été testé en présence d'isopropanol simple sans ajout de PMSF. On voit que ce solvant a un effet négatif fort sur l'activité de l'ICS par rapport à la situation contrôle. Cependant, l'activité de l'ICS est encore décelable par la présence d'un léger pic de diCQA.

Par la suite, les extraits enzymatiques ont été mis en présence de CQA et de 1 ou 10 mM de PMSF. On note une incidence de ce produit. Plus la concentration en PMSF est élevée, plus la concentration en diCQA produit par l'ICS est faible.

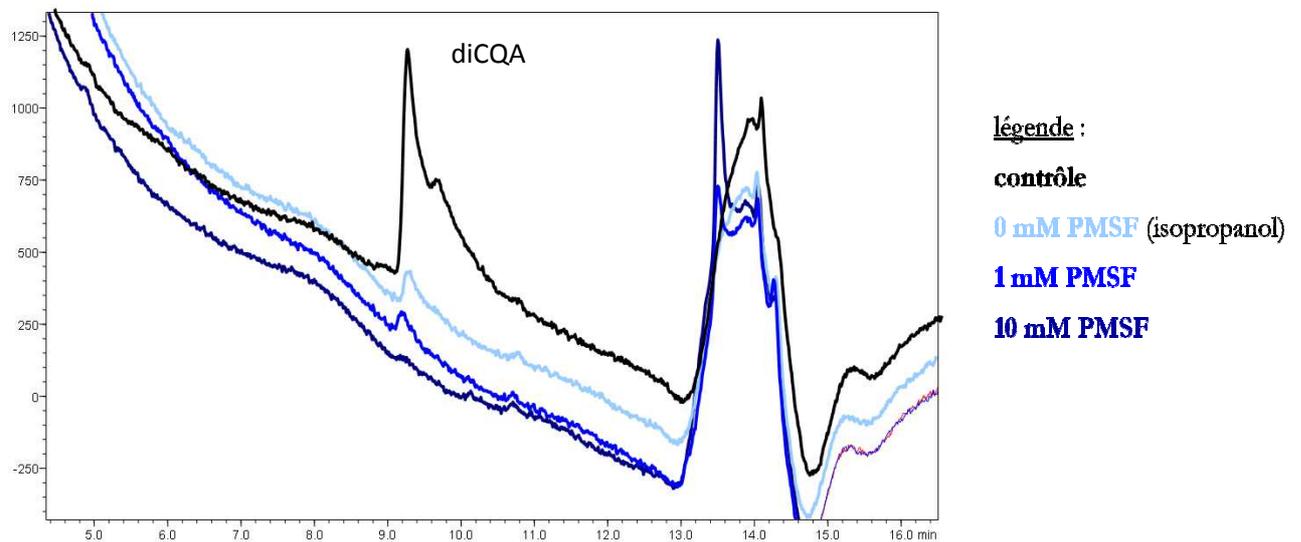


Figure 3.38 : Tests enzymatiques réalisés dans des milieux enrichis en PMSF. Tests réalisés avec la fraction Eo.

Notre enzyme semble effectivement être sensible au PMSF. Néanmoins, une comparaison avec une enzyme non sensible aurait permis d'être plus affirmatif. Nous pouvons toutefois encore se laisser surprendre par la robustesse de l'ICS.

Discussion et perspectives

Deux mécanismes pour la synthèse de diCQA sont possibles : une activité caféoyl-CoA : chlorogénate caféoyltransférase, comme c'est le cas pour une HCT de caféier, ou une activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase, comme pour une HQT de tomate (Lallemand *et al.*, 2012 ; Moglia *et al.*, 2014). Les HCTs et HQTs identifiées chez la chicorée ne semblent pas être responsables de la synthèse de diCQA dans la plante. En effet, aucune activité n'a été décelée dans les conditions testées et quelque soit le mécanisme envisagé. Les conditions favorables à la synthèse n'ont peut-être pas été identifiées, néanmoins, il semble peu probable que des enzymes aussi restrictives dans leur rôle de production de diCQA soient responsables de l'accumulation forte de cette molécule dans certains organes (jeunes feuilles).

Nos travaux de purification de l'ICS chez la patate douce n'ont d'ailleurs pas mis en exergue d'HCT ou d'HQT. Les caractéristiques de cette enzyme, dotée d'une activité chlorogénate : chlorogénate caféoyltransférase, ne correspondent pas à celles des enzymes de la famille des BAHD. En effet, l'ICS aurait une taille proche de 30 kDa (ou de 25 kDa, d'après Villegas *et al.*, 1987), alors qu'elle est de l'ordre de 50 kDa pour les HCT et HQT. Les résultats de séquençage en fin de protocole ont plutôt permis d'identifier une séquence candidate proche de celle de la chlorogénate : glucarate caféoyltransférase SICGT caractérisée par Teutschbein (2010) appartenant à la famille des GDSL esterase / lipases. C'est ce qui a, notamment, retenu notre attention. Cette famille est composée de protéines dont la taille est comprise entre 22 et 60 kDa (Akoh *et al.*, 2004). Elles utilisent les acyl-CoAs, des dérivés d'acides aminés et des esters comme substrats. La SICGT a, en effet, une activité de transférase et utilise comme substrat le caféoylquinone pour la production de caféoylgalactarate et de caféoylglucarate. La SICGT est donc une GDSL lipase-like protéine ayant perdu son activité hydrolytique et qui a acquis une autre fonction au sein du métabolisme spécialisé, celle d'acyltransférase dans la synthèse d'esters d'acides hydroxycinnamiques. Elle utilise le CQA comme substrat et transfère un groupement caféoyl du CQA vers une molécule acceptrice, le glucarate ou le galactarate (figure 3.39). De plus, de telles protéines sont impliquées dans la régulation du développement, dans la morphogénèse, dans la synthèse de métabolites spécialisés et de composés impliqués dans les mécanismes de défense (Chepyshko *et al.*, 2012). Il s'avère donc que les GDSL lipases ne sont pas seulement impliquées dans le métabolisme lipidique mais aussi dans d'autres fonctions du métabolisme primaire et spécialisé comme c'est le cas de la SICGT (Teutschbein *et al.*, 2010), la protéine avec laquelle la séquence identifiée dans nos investigations présente un fort taux de similarité. L'expression du gène codant la SICGT et son activité enzymatique sont dépendantes du

stade de développement dans les feuilles. En effet, l'expression du gène est plus importante dans les feuilles et ceci s'accompagne d'une accumulation de caféoylglucarate. L'activité SICGT est présente de façon prédominante dans les feuilles, avec des valeurs beaucoup plus fortes dans les feuilles âgées. Dans le chapitre 1 de ce manuscrit, nous avons pu observer également des différences quantitatives des teneurs en diCQA dans les organes chez la chicorée.

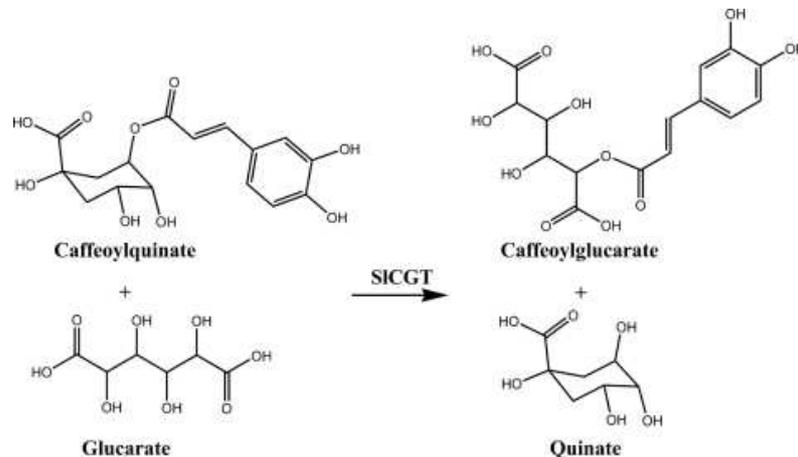


Figure 3.39 : Réaction de transfert catalysée par la SICGT (Teutschbein *et al.*, 2014)

Néanmoins, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour identifier avec rigueur la séquence potentielle complète. Une séquence génomique a pu être identifiée. Les données transcriptomiques prévoient l'existence de deux ARNm pour ce même gène. L'un donnerait après traduction un peptide de 34 kDa et l'autre un peptide de 41 kDa.

Ainsi, ces données n'excluent pas de tenter par la suite le clonage de ces séquences, de produire des protéines recombinantes dans des systèmes hétérologues et enfin de tester son activité hypothétique de synthèse de diCQA à partir de CQA. A court terme, il est donc possible d'envisager le clonage de la lipase 1, avec ou sans son peptide d'adressage, la lipase 2 et l'introduction de vecteurs d'expression contenant ces séquences chez *E. coli*, chez la levure ou encore chez le tabac. D'ailleurs, le tabac sera privilégiée dans un premier temps car les transformations chez les micro-organismes peuvent être plus incertaines. Cela a été le cas, par exemple, avec l'introduction de Nt4Cl et CcHCT chez la levure (Moglia *et al.*, 2010) dans le but d'induire une forte production en CQA. Le métabolite produit par CcHCT n'était pas le CQA mais l'acide N-(E)-*p*-coumaroyl-3-hydroxyanthranilique à partir d'acide *p*-coumarique et d'acide 3-hydroxyanthranilique. Enfin, l'introduction de la SICGT chez *E. coli* ou *Saccharomyces cerevisiae* n'a pas donnée de résultats satisfaisants (Teutschbein *et al.*, 2010).

L'optimisation du protocole de purification a pu également nous fournir des informations qui pourront être utiles pour la suite : perte d'activité de l'ICS en présence de citrate et inversement, activité plus forte avec un tampon Hepes.

Si l'exploitation de ces séquences ne donne pas les résultats attendus, il sera possible de repartir du résultat de séquençage sur gel et d'exploiter d'autres séquences. Des études du séquençage de portion de gel IEF contenant l'activité pourrait permettre d'affiner la recherche en couplant les résultats à ceux obtenus sur gel SDS-PAGE.

Conclusion générale

Les composés phénoliques constituent l'une des principales classes de métabolites spécialisés chez les végétaux. Considérés il y a encore quelques temps comme produits « déchets », voire des erreurs métaboliques, leur importance pour la plante est de plus en plus reconnue. Cette famille chimique comporte des molécules aux structures diverses, mais qui possèdent toutes un cycle aromatique hydroxylé. On trouve des formes simples, telles que les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques et les flavonoïdes ainsi que des formes plus complexes, telles que les tanins ou la lignine. Ils jouent un rôle dans le processus de germination, dans le soutien de la plante et dans la détoxification des formes activées de l'oxygène grâce à leurs propriétés antioxydantes et leur capacité à maintenir l'homéostasie des concentrations en ROS. Les polyphénols entrent en jeu également dans les interactions plante-environnement. Ils peuvent être accumulés à la suite d'un stress, participer à la mise en place d'une relation symbiotique dans le cas de certaines espèces, protéger la plante contre différents types d'agressions, tels que les UVs, ou encore favoriser la reproduction de l'espèce végétale en attirant les pollinisateurs.

Pour l'Homme, ces composés possèdent également un vaste potentiel de valorisation. Ils occupent une place importante dans les caractéristiques du végétal d'ornement (coloris, odeur...), pouvant amener à des innovations intéressantes. Ceux-ci sont également impliqués dans les qualités sensorielles et nutritionnelles des aliments. De plus, les perspectives d'utilisation de ces composés dans des compléments alimentaires ou dans des médicaments sont nombreuses du fait de leurs nombreux bienfaits.

Chaque espèce végétale possède sa propre empreinte moléculaire. Cela constitue une ressource d'une grande diversité et d'une extrême richesse. La chicorée est une plante déjà bien valorisée d'un point de vue industriel, comme plante fourragère, en tant que produits alimentaires ou comme source d'inuline. Son originalité métabolique pourrait être de même exploitée, ou d'une certaine manière être utilisée comme source d'informations afin de valoriser ces métabolites spécialisés grâce à des techniques de biotechnologie. Cela a constitué la finalité de cette étude. En effet, la chicorée accumule majoritairement et de façon originale quatre polyphénols, les CQA, CTA, diCQA et diCTA (Heimler *et al.*, 2007). Ce sont des acides hydroxycinnamiques qui ont en commun d'être des esters d'acide caféique. Par ailleurs, les esters multiples d'acide caféiques (2 ou 3 groupements caféoyles) sont particulièrement convoités dans les travaux de recherche du fait de leur meilleure efficacité thérapeutique (Wang *et al.*, 2003 ; Islam, 2006). Plusieurs travaux ont attestés de l'intérêt particulier à avoir pour les diCTA et diCQA (Robinson, 1998 ; Hao *et al.*, 2012). Enfin, d'un point de vue fondamental, ces travaux apportent également des connaissances sur l'établissement des flux métaboliques à partir de l'acide caféique. Celui-ci s'avère être un composé central qui intervient dans la synthèse d'un bon nombre de molécules importantes pour la plante dont la lignine. Cet acide a une répartition quasi-universelle dans le règne végétal.

Seule la synthèse du CQA est bien caractérisée. Elle nécessite l'intervention de deux types d'enzymes appartenant à la famille des BAHD, les HCT et HQT. Les HQTs sont spécifiques des plantes, dont la chicorée, qui produisent et accumulent le CQA en grande quantité (Niggeweg *et al.*, 2004). Ces deux types d'enzymes ont à la fois la capacité de former du coumaroylquinone et du coumaroylshikimate à partir de coumaroyl-CoA et d'hydrolyser ces mêmes composés. Ces dérivés de l'acide coumarique sont les molécules de base pour la production dans un second temps des 3 autres composés phénoliques de la chicorée. Les HCT et HQT utilisent un large spectre de substrats et il est tentant de penser qu'elles interviennent de façon privilégiée dans un bon nombre de réactions de la voie de biosynthèse des polyphénols. En effet, elles sont capables dans certaines conditions de produire du diCQA (Lallemand *et al.*, 2012 ; Moglia *et al.*, 2014). Malgré tout, pour la synthèse de ce composé phénolique, il semblerait qu'une autre protéine soit impliquée et celle-ci ne serait pas nécessairement une enzyme de la famille des BAHD (Villegas *et al.*, 1987).

Durant ce travail, nous avons donc voulu nous concentrer sur cette partie de la voie de biosynthèse des polyphénols de la chicorée, à savoir la synthèse de diCQA, qui comporte encore des zones d'interrogations.

Afin d'identifier les effecteurs de la voie de biosynthèse du diCQA d'une manière non ciblée, notre but, dans un premier temps, a été de mettre en place un protocole d'accumulation différentielle de diCQA à partir du matériel végétal à disposition. Ce procédé nous a fourni pour la suite des conditions contrastées d'expression génique. Ces gènes dont l'expression est modulée de façon conjointe à une accumulation de diCQA dans le matériel sont donc des candidats intéressants pouvant être impliqués dans la voie de biosynthèse du diCQA. Tout cela repose sur l'hypothèse que des perturbations des statuts métaboliques sont associées à des modifications des profils transcriptionnels des gènes impliqués dans la production de diCQA.

Cet objectif s'est donc traduit en la recherche de conditions modulatrices de l'accumulation des polyphénols de chicorée. De telles conditions ont pu être générées sur des explants foliaires par l'ajout de CQA au milieu d'incubation. Cette supplémentation permet l'augmentation des teneurs internes en CQA et diCQA. De la même façon, nous avons pu provoquer une accumulation de diCQA sur cultures cellulaires de racines de chicorée par l'ajout de MeJA dans le milieu de culture.

De nombreuses informations complémentaires ont pu être tirées de ces investigations. Tout d'abord, chez la chicorée, deux types de profils métaboliques peuvent être discriminés : un profil de co-accumulation de CQA, CTA et diCTA, caractéristiques des feuilles et un profil de co-accumulation de CQA et de diCQA, caractéristique des racines. La possibilité d'induire l'accumulation de diCQA dans les feuilles nous prouve que la machinerie biosynthétique nécessaire à la production de diCQA est

présente et peut être activée dans les feuilles. Ces signatures métaboliques caractéristiques du type de tissu constituent un point d'intérêt fondamental dans la compréhension des voies de biosynthèse des polyphénols. Cette différence de profils résulte-t-elle d'un transport des composés à travers la plante ou d'une régulation contrastée des voies de biosynthèse ? Sommes-nous en présence d'une voie métabolique unique ou ajustée à chaque organe ? Pour pouvoir répondre à cette question, la connaissance des déterminants moléculaires à l'origine de la régulation de la synthèse de ces composés et de leur accumulation est nécessaire.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence un gradient de répartition des polyphénols qui s'étale sur les différents étages foliaires de la plante. Plus la feuille est jeune, plus la teneur en composés phénoliques est importante, quelque soit la molécule. Ce résultat est cohérent avec le potentiel rôle de défenses de ces composés. En effet, pour la plante, il est vital de protéger au mieux les jeunes tissus face à d'éventuels agressions.

Ainsi, nous avons pu déceler plusieurs conditions d'accumulation différentielle de diCQA chez la chicorée. En premier lieu, il existe une différence que l'on pourrait qualifier de naturelle fondée sur la répartition tissu-spécifique ou encore une répartition contrastée selon l'âge des feuilles. En deuxième lieu, nous pouvons induire l'accumulation de diCQA à la fois dans les racines, par l'action du MeJA, et dans les feuilles, grâce à l'ajout de CQA au milieu d'incubation d'explants ou également par l'élicitation au MeJA.

En parallèle à ce travail sur la plante, 5 gènes de la famille des BAHD ont été identifiés et caractérisés d'un point de vue moléculaire et biochimique : 2 HCTs et 3 HQTs. Confirmant les données de la littérature, les HCTs utilisent de façon privilégiée le shikimate et les HQTs, le quinate. Les réactions sont réversibles. A ce stade, on peut s'interroger des raisons de l'existence de ces gènes dupliqués ? Est-ce le résultat d'une évolution visant à optimiser les flux vers une accumulation des différents métabolites ? Des différences d'expression semblent cependant les différencier. En effet, nous avons pu montrer que le MeJA, induisant l'accumulation de CQA et de diCQA dans les cultures cellulaires de racines, provoque également une augmentation des expressions du gène codant CiHQT3 et de façon plus légère des gènes codant CiHCT1 et CiHCT2. Il serait intéressant de réaliser la même approche dans les feuilles afin d'établir l'implication respective de chacun des gènes.

Nous avons pu également constater qu'aucune de ces 5 enzymes n'est capable de synthétiser *in vitro* du diCQA, du moins dans nos conditions expérimentales. Ainsi, l'hypothèse de l'existence d'un autre type enzymatique conduisant à la biosynthèse de ce composé se justifiait. Cette hypothèse va dans le sens des observations de Villegas, qui avait mis en évidence chez la patate douce une protéine responsable de la synthèse de diCQA mais qui ne possédait pas les caractéristiques de la famille des

BAHD (Villegas *et al.*, 1987). En effet, la taille de la protéine est différente de celle des HCTs et HQTs et la protéine de patate douce possède une forte affinité pour le CQA ($K_m = 0,87 \text{ mM}$) contrairement à ces dernières enzymes (K_m de l'ordre de 16 mM pour SIHQT) (Moglia *et al.*, 2014).

Le travail réalisé à partir du protocole de purification émis par Villegas a permis de mettre en évidence une protéine candidate qui serait responsable de la synthèse de diCQA. Il s'agirait d'une enzyme de la famille des GDSL estérases / lipases. Au cours de notre cheminement vers la purification de l'ICS, nous avons pu remarquer également que l'activité de cette enzyme est inhibée par le tampon citrate et le PMSF. Cette enzyme est robuste car elle résiste à la dureté du protocole (gel SDS, utilisation d'agents réducteurs). Enfin, la taille mesurée serait proche de 30 kDa. La séquence candidate obtenue chez la patate douce possède un fort taux de similarité avec la SICGT mise en évidence chez la tomate. Cette enzyme a le CQA pour substrat privilégié et synthétise le caféoylglucarate *via* le transfert d'un groupement caféoyl d'un CQA vers un acide glucarique. Deux homologues de la séquence de patate douce ont été identifiés chez la chicorée. Une première séquence est de taille plus importante (41 kDa) que la deuxième (34kDa).

Ce travail sera poursuivi par le clonage des séquences candidates de chicorée, la production de protéines recombinantes et l'établissement des tests enzymatiques *in vitro* nécessaires pour attester de son activité de production de diCQA.

Dans la même logique, la voie de synthèse des CTA et diCTA a tout intérêt à être élucidée. Une séquence codant potentiellement la CTT a été identifiée au laboratoire et est en cours d'étude.

Ces différents résultats de thèse ont permis, en premier lieu, de développer des outils méthodologiques pour appréhender les voies de biosynthèse des polyphénols chez la chicorée : constitution de données génomiques et de banques d'ESTs, transcriptomes... D'autre part, si l'identification de l'ICS s'avère confirmée par les tests complémentaires, la production de diCQA pourra être envisagée dans des systèmes hétérologues tels que les levures. Ces systèmes permettront de produire plus facilement cette molécule d'intérêt nutritionnel et thérapeutique et de diminuer les coûts de production. D'un point de vue agronomique, on peut imaginer des projets d'amélioration végétale vers des variétés plus riches en ces composés bienfaiteurs. Une concentration plus importante ferait de la chicorée un aliment davantage valorisant d'un point de vue nutritionnel. On peut également imaginer que celle-ci par cette composition métabolique différente soit plus résistante face aux différents pathogènes. Il faut, cependant, bien prendre en compte, que ces composés phénoliques peuvent impliquer des bouleversements concernant les

perceptions gustatives des différents produits issus de la chicorée. En effet, un lien très fort entre ces molécules et l'amertume est établi.

Au niveau des connaissances fondamentales, ces informations pourront nous permettre également d'avancer dans l'identification de l'enzyme responsable de l'accumulation de diCTA. Le mécanisme biosynthétique est similaire et pourrait impliquer le même type de protéines. Les applications liées à l'exploration des voies de biosynthèse de ces 4 polyphénols en cosmétique, pharmacie et industrie alimentaire sont nombreuses.

Cette étude a porté avant tout sur les effecteurs des voies métaboliques des polyphénols. Les études transcriptomiques nous offrent la possibilité d'explorer également les régulateurs de ces voies. Cela pourrait être plus pertinent et prometteur dans une volonté de modulation des voies biosynthétiques. En effet, l'effet engendré par les facteurs de transcription pourrait s'avérer plus importants et significatifs qu'une simple action sur une enzyme entrant en jeu dans les réactions en bout de voie de synthèse.

A l'image de la persévérance de St Sébastien, ces travaux sur la chicorée sont poursuivis au laboratoire dans le cadre d'une nouvelle thèse.

Bibliographie

- Acker, S. a B.E. Van, Berg, D.J. Van Den, Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Bennekom, W.P. Van, Vijgh, W.J.F. Van Der and Bast, A.** (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, **20**, 331–342.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. and Tattini, M.** (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci.*, **196**, 67–76.
- Aharoni, a, Keizer, L.C., Bouwmeester, H.J., et al.** (2000) Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, **12**, 647–662.
- Aharoni, A., Jongsma, M. a. and Bouwmeester, H.J.** (2005) Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci.*, **10**, 594–602.
- Akhtar, T. a., Matsuba, Y., Schauvinhold, I., Yu, G., Lees, H. a., Klein, S.E. and Pichersky, E.** (2013) The tomato cis-prenyltransferase gene family. *Plant J.*, **73**, 640–652.
- Akoh, C.C., Lee, G.C., Liaw, Y.C., Huang, T.H. and Shaw, J.F.** (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.*, **43**, 534–552.
- Amiot, M.J., Fleuriet, a and Macheix, J.J.** (1986) Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J Agric. Food Chem.*, **34**, 823–826.
- Apostol, I., Low, P.S., Heinstejn, P., Stipanovic, R.D. and Altman, D.W.** (1987) Inhibition of elicitor-induced phytoalexin formation in cotton and soybean cells by citrate. *Plant Physiol.*, **84**, 1276–1280.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R.** (2005) Pre-Sowing Seed Treatment—A Shotgun Approach to Improve Germination, Plant Growth, and Crop Yield Under Saline and Non-Saline Conditions. *Adv. Agron.*, **88**, 223–271.
- Atkinson, P. and Blakeman, J.P.** (1982) Seasonal occurrence of an antimicrobial flavanone, sakuranetin, associated with glands on leaves of *Ribes nigrum*. *New Phytol.*, **92**, 63–74.
- Aziz, M.M., Raza, M.A., Saleem, H., Wajid, M., Bashir, K. and Ikram, M.** (2014) Medicinal values of Herbs and Plants , Importance of Phytochemical evaluation and Ethnopharmacological Screening : An Illustrated review essay. *J. Pharm. Cosmet. Sci.*, **2** (1), 6–10.
- Bahri, M., Hance, P., Grec, S., Quillet, M.-C., Trotin, F., Hilbert, J.-L. , Hendriks, T.** (2012) A “novel” protocol for the analysis of hydroxycinnamic acids in leaf tissue of chicory (*Cichorium intybus* L., *Asteraceae*). *Sci. World J.*, **2012**, 8.
- Barrows, E.M.** (1977) Floral maturation and insect visitors of *Pachyptera hymenae* (*Bignoniaceae*). *Biotropica.*, **9** (2), 133-134.
- Barrows, E.M.** (1976) Nectar robbing and pollication of *Lantana camara* (*Verbenaceae*). *Biotropica.*, **8** (2), 132-135.
- Bate, N.J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P.W., Dixon, R.A., Lamb, C.J. and Elkind, Y.** (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 7608-7612.

- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M. and Boerjan, W.** (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **17** (2), 125-197.
- Bayer, A., Ma, X. and Stöckigt, J.** (2004) Acetyltransfer in natural product biosynthesis--functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 2787-2795.
- Beckman, C.H.** (2000) Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **57**, 101-110.
- Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F.W. a, Bouwmeester, H.J. and Aharoni, A.** (2004) Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.*, **135**, 1865-1878.
- Bell-Lelong, D. a, Cusumano, J.C., Meyer, K. and Chapple, C.** (1997) Cinnamate-4-hydroxylase expression in Arabidopsis. Regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol.*, **113**, 729-738.
- Bennett, R.N. and Wallsgrave, R.M.** (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.*, **127**, 617-633.
- Bertelli A.A. et Das DK.** (2009) Grapes, wines, resveratrol and heart health. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **54** (6), 468-476
- Beuerle, T. and Pichersky, E.** (2002) Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme A esters. *Anal. Biochem.*, **302**, 305-312.
- Bhuwaneshwar, S.M., Singh, M., Aggrawal, P. and Laxmi, A.** (2009) Glucose and Auxin Signaling Interaction in Controlling Arabidopsis thaliana Seedlings Root Growth and Development. *PLoS One*, **4** (2), e4502.
- Bielen, A., Četković, H., Long, P.F., Schwab, H., Abramić, M. and Vujaklija, D.** (2009) The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl)esterase and a true lipase activity. *Biochimie*, **91**, 390-400.
- Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V.** (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.*, **91**, 179-194.
- Boels, L. and Witkamp, G.J.** (2011) Carboxymethyl inulin biopolymers: A green alternative for phosphonate calcium carbonate growth inhibitors. *Cryst. Growth Des.*, **11**, 4155-4165.
- Böhm, A., Kaiser, I., Trebstein, A. and Henle, T.** (2005) Heat-induced degradation of inulin. *Eur. Food Res. Technol.*, **220**, 466-471.
- Bonnema, A.L., Kolberg, L.W., Thomas, W. and Slavin, J.L.** (2010) Gastrointestinal Tolerance of Chicory Inulin Products. *J. Am. Diet. Assoc.*, **110** (6), 865-868.
- Bontpart, T., Cheynier, V., Ageorges, A. and Terrier, N.** (2015) BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. *New Phytol.*

- Burhenne, K., Kristensen, B.K. and Rasmussen, S.K.** (2003) A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases: Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3.1.64). *J. Biol. Chem.*, **278**, 13919–13927.
- Campbell, M.M. and Ellis, B.E.** (1992) Fungal Elicitor-Mediated Responses in Pine Cell Cultures : III. Purification and Characterization of Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Physiol.*, **98**, 62-70.
- Canon, F.** (2010) Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riches en proline et les tannins. Thèse de doctorat, Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques, France. 272p.
- Carazzone, C., Mascherpa, D., Gazzani, G. and Papetti, A.** (2013) Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chem.*, **138**, 1062-1071.
- Chapple, C.** (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 311-343.
- Chen, Y.L., Huang, S.T., Sun, F.M., Chiang, Y.L., Chiang, C.J., Tsai, C.M. and Weng, C.J.** (2011) Transformation of cinnamic acid from trans- to cis-form raises a notable bactericidal and synergistic activity against multiple-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **43**, 188–194.
- Chen, L., Chang, Y., Zheng, H., Ma, J. and Chang, X.** (2004) The experimental study of CPS anti-tumor. *Food Sci.*, **25**, 276-280.
- Chepyshko, H., Lai, C.-P., Huang, L.-M., Liu, J.-H. and Shaw, J.-F.** (2012) Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. japonica) genome: new insights from bioinformatics analysis. *BMC Genomics*, **13**, 309.
- Choi, J., Park, J.-K., Lee, K.-T., Park, K.-K., Kim, W.-B., Lee, J.-H., Jung, H.-J. and Park, H.-J.** (2005) In Vivo Antihepatotoxic Effects of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and the Identification of the Active Component, 3,4-Dicaffeoylquinic Acid. *J. Med. Food*, **8**, 348–352.
- Choi, Y.J., Tomás-Barberán, F.A. and Saltveit, M.E.** (2005) Wound-induced phenolic accumulation and browning in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf tissue is reduced by exposure to n-alcohols. *Postharvest Biol. Technol.*, **37**, 47-55.
- Chong, J., Poutaraud, A. and Hugueney, P.** (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.*, **177**, 143–155.
- Clifford, M.N.** (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 362–372.
- Clifford, M.N.** (2000) Review Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. food Agric.*, **80**, 1033–1043.

- Closs, B.** (2002) Valorisation des polyphénols en cosmetologie. *In: Polyphenols 2002. Recent advances in polyphenols research. XXI International Conference on Polyphenols. Marrakech, University Cadi Ayyad, Faculty of Sciences Semlalia.* 186-191.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for Agro- bacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16** (6), 735-743.
- Collinge, D.B. and Slusarenko, A.J.** (1987) Plant gene expression in response to pathogens. *Plant Mol. Biol.*, **9**, 389–410.
- Comino, C., Hehn, A., Moglia, A., Menin, B., Bourgaud, F., Lanteri, S. and Portis, E.** (2009) The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. *BMC Plant Biol.*, **9** (30), 1-13.
- Comino, C., Portis, E., Acquadro, A., Pinelli, P., Hehn, A., Bourgaud, F. and Lanteri, S.** (2007) Isolation of a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenyl-propanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L. *In Acta Horticulturae.*, **7** (14), 1-14.
- Costaglioli, P., Joubès, J., Garcia, C., Stef, M., Arveiler, B., Lessire, R. and Garbay, B.** (2005) Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1734**, 247–258.
- D’Auria, J.C.** (2006) Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 331-340.
- Dai, G.H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L. and Boubals, D.** (1995) Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Eur. J. Plant Pathol.*, **101**, 541-547.
- Del-Castillo-Alonso, M.Á., Diago, M.P., Monforte, L., Tardaguila, J., Martínez-Abaigar, J. and Núñez-Olivera, E.** (2014) Effects of UV exclusion on the physiology and phenolic composition of leaves and berries of *Vitis vinifera* cv. Graciano. *J. Sci. Food Agric.*, **95**, 409-416.
- Delporte, M., Legrand, G., Hilbert, J.-L. and Gagneul, D.** (2015) Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus*. *Front. Plant. Sci.*, **6**, 651.
- Del Rio, J.A., Cruz Arcas, M., Benavente, O., Sabater, F. and Ortuno, A.** (1998) Changes of polymethoxylated flavones levels during development of *Citrus aurantium* (cv. Sevillano) fruits. *Planta Med.*, **64** (6), 575-576.
- Demidchik, V., Cuin, T. a, Svistunenko, D., Smith, S.J., Miller, A.J., Shabala, S., Sokolik, A. and Yurin, V.** (2010) *Arabidopsis* root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J. Cell Sci.*, **123**, 1468–1479.
- Desprez, B., Delesalle, L., Dhellemmes, C. and Desprez, M.** (1994) Genetics and breeding of industrial chicory. *Comptes Rendus de l’académie d’Agriculture de France.*, **80**, 47-62.

- Dicosmo, F. and Misawa, M.** (1995) Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnol. Adv.*, **13** (3), 425-453.
- Dittbrenner, a., Mock, H.P., Börner, a. and Lohwasser, U.** (2009) Variability of alkaloid content in *Papaver somniferum* L. *J. Appl. Bot. Food Qual.*, **82**, 103–107.
- Dixon, R. a** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, **411**, 843–847.
- Dixon, R. and Paiva, N.** (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell.*, **7**, 1085-1097.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C. and Courot, E.** (2009) Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol.*, **27**, 706–13.
- Drewnowski, a and Gomez-Carneros, C.** (2000) Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 1424–1435.
- Dudareva, N., D’Auria, J.C., Nam, K.H., Raguso, R.A. and Pichersky, E.** (1998) Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J.*, **14**, 297–304.
- Duggleby, R.G. and Dennis, D.T.** (1973) Pyruvate kinase, a possible regulatory enzyme in higher plants. *Plant Physiol.*, **52**, 312–317.
- Duthie, G.G., Gardner, P.T. and Kyle, J.A.M.** (2003) Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc. Nutr. Soc.*, **62**, 599-603.
- Edwards, K., Cramer, C.L., Bolwell, G.P., Dixon, R.A., Schuch, W. and Lamb, C.J.** (1985) Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **82**, 6731-6735.
- Eenink, a. H.** (1981) Compatibility and incompatibility in witloof-chicory (*Cichorium intybus* L.). 2. The incompatibility system. *Euphytica*, **30**, 77–85.
- Eenink, a. H.** (1982) Compatibility and incompatibility in witloof-chicory (*Cichorium intybus* L.). 3. Gametic competition after mixed pollinations and double pollinations. *Euphytica*, **31**, 773–786.
- Elattar T.M.A. et Virji A.S.** (1999) Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. *Anti-Cancer Drugs*, **10** (2), 187-193.
- El-Sharkawy, I., Manríquez, D., Flores, F.B., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A. and Pech, J.C.** (2005) Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol. Biol.*, **59**, 345-362.
- Escamilla-Treviño, L.L., Shen, H., Hernandez, T., Yin, Y., Xu, Y. and Dixon, R.A.** (2014) Early lignin pathway enzymes and routes to chlorogenic acid in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Mol. Biol.*, **84** (4-5), 565-576.
- Fairbairn, J.W. and Wassel, G.** (1964) The alkaloids of *Papaver somniferum* L. evidence for a rapid turnover of the major alkaloids. *Phytochemistry.*, **3**, 253-258. 1964.

- Feeny, P. and Bostock, H.**(1968) Seasonal changes in the tannin content of oak leaves. *Phytochemistry.*, **7**, 871-880.
- Feild, T.S., Lee, D.W. and Holbrook, N.M.** (2001) Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. *Plant Physiol.*, **127**, 566-574.
- Feng, Y., Wang, X., Yang, S., et al.** (2009) Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *Neurotoxicology*, **30**, 986-995.
- Feng, Q., Torii, Y., Uchida, K., Nakamura, Y., Hara, Y. and Osawa, T.** (2002) Black tea polyphenols, theaflavins, prevent cellular DNA damage by inhibiting oxidative stress and suppressing cytochrome P450 1A1 in cell cultures. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 213-220.
- Ferdinando, M. Di, Brunetti, C., Agati, G. and Tattini, M.** (2014) Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environ. Exp. Bot.*, **103**, 107–116.
- Fisher, C.** (1992) Phenolic compounds in spices. *In: Phenolic compounds in food and their effects on health I. Analysis, Occurrence and Chemistry.* Ho C.T., Lee C.Y., Huang M.T. eds, Washington, 118-129.
- Fleuriet, A., Uhel, C., Dédaldéchamp, F. and Dedaldechamp, F.** (1996) Acta Botanica Gallica: Botany Letters Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme Les composés phénoliques et la qualité des produits d'origine végétale consommés par l'homme. *Acta Bot. Gall. Bot. Lett. Acta bot. Gallica*, **1436**, 493–500.
- Flowers, T.J. and Colmer, T.D.** (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.*, **179**, 945–963.
- Franck, A.** (2002) Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.*, **87 Suppl. 2**: 287-291.
- Franck, A. and Coussement, P.** (1997) Multi-functional inulin. *Foods ingredients and analysis international.*, **Oct.**, 8-10.
- Fraser, P.D., Romer, S., Shipton, C. a, Mills, P.B., Kiano, J.W., Misawa, N., Drake, R.G., Schuch, W. and Bramley, P.M.** (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 1092–1097.
- Fricke, W. and Peters, W.S.** (2002) The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiol.*, **129**, 374–388.
- Gális, I., Šimek, P., Narisawa, T., Sasaki, M., Horiguchi, T., Fukuda, H. and Matsuoka, K.** (2006) A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *Plant J.*, **46**, 573-592.
- Gardès-albert, M., Bonnefont-rousselot, D., Abedinzadeh, Z. and Jore, D.** (2003) Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *Actual. Chim.*, 91–96.
- Geyter, N. De, Gholami, A., Goormachtig, S. and Goossens, A.** (2012) Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.*, **17**, 349-359.

- Ghanaatiyan, K. and Sadeghi, H.** (2015) Divergences in hormonal and enzymatic antioxidant responses of two chicory ecotypes to salt stress. *Plant Signal. Behav.*
- Gonthier, L., Blassiau, C., Mörchen, M., Cadalen, T., Poiret, M., Hendriks, T. and Quillet, M.C.** (2013) High-density genetic maps for loci involved in nuclear male sterility (NMS1) and sporophytic self-incompatibility (S-locus) in chicory (*Cichorium intybus* L., Asteraceae). *Theor. Appl. Genet.*, **126**, 2103–2121.
- Gonthier, L., Bellec, A., Blassiau, C., Prat, E., Helmstetter, N., Rambaud, C., Huss, B., Hendriks, T., Berges, H. and Quillet, M.-C.** (2010) Construction and characterization of two BAC libraries representing a deep-coverage of the genome of chicory (*Cichorium intybus* L. Asteraceae). *BMC Res. Notes.*, **3**, 225.
- Grace, S.C. and Logan, B.A.** (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **355** (1402), 1499-1510.
- Grienenberger, E.** (2010) Analyse fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat, université de Strasbourg. 132p.
- Grienenberger, E., Besseau, S., Geoffroy, P., Debayle, D., Heintz, D., Lapierre, C., Pollet, B., Heitz, T. and Legrand, M.** (2009) A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J.*, **58**, 246-259.
- Gross, G.G. and Zenk, M.H.** (1974) Isolation and properties of hydroxycinnamate: CoA ligase from lignifying tissue of Forsythia. *Eur. J. Biochem.*, **42**, 453-459.
- Grothe, T., Lenz, R. and Kutchan, T.M.** (2001) Molecular Characterization of the Salutaridinol 7-O-Acetyltransferase Involved in Morphine Biosynthesis in Opium Poppy *Papaver somniferum*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30717–30723.
- Gu, R., Dou, G., Wang, J., Dong, J. and Meng, Z.** (2007) Simultaneous determination of 1,5-dicaffeoylquinic acid and its active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **852**, 85–91.
- Halliwell, B.** (1978) Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS Lett.*, **92**, 321–326.
- Hamed, K. Ben, Debez, A., Chibani, F. and Abdelly, C.** (2004) Salt response of *Crithmum maritimum*, an oleagineous halophyte. *Trop. Ecol.*, **45** (1), 151-159.
- Hammer, K., G, G.T.L. and Pignone, D.** (2013) *Cichorium intybus* L. as a root vegetable in Italy and remarks on the infraspecific classification of the cultivated races of this species. *Int. J.*, **3**, 928–937.
- Hao, B.J., Wu, Y.H., Wang, J.G., Hu, S.Q., Keil, D.J., Hu, H.J., Lou, J.D. and Zhao, Y.** (2012) Hepatoprotective and antiviral properties of isochlorogenic acid A from *Laggera alata* against hepatitis B virus infection. *J. Ethnopharmacol.*, **144**, 190-194.

- Harborne, J.B.** (1995) Plant polyphenols and their role in plant defense mechanisms. In: *Polyphenols 94*. INRA Editions, Paris. 19-26.
- Hart J.H.** (1981). Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **19**, 437-458
- Hartman, T.G., Kamas, K., Chen, J., Shevade, A., Deagro, M. and Hwang, H.I.** (1992) Determination of vanillin, other phenolic compounds, and flavors in vanilla bean: direct thermal desorption-gas chromatography and - gas chromatography – mass spectrometric analysis. In: Phenolic compounds in food and their effects on health I. Analysis, Occurrence and Chemistry. Ho C.T., Lee C.Y., Huang M.T. eds, Washington, 60-76.
- Hartmann, T.** (1991) Alkaloids. In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites I: The Chemical Participants*, ed. GA Rosenthal, MR Berenbaum, pp. 79-121. San Diego: Academic.
- Hättenschwiler, S. and Vitousek, P.M.** (2000) The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends Ecol. Evol.*, **15** (6), 238-243.
- Hazra, B., Sarkar, R., Bhattacharyya, S. and Roy, P.** (2002) Tumour inhibitory activity of chicory root extract against Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Fitoterapia.*, **73**, 730-733.
- Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P. and Romani, A.** (2009) Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chem.*, **114**, 765-770.
- Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P., Tombelli, S. and Romani, A.** (2007) Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1724-1729.
- Hodgins, K.A., Lai, Z., Oliveira, L.O., et al.** (2014) Genomics of Compositae crops: reference transcriptome assemblies and evidence of hybridization with wild relatives. *Mol. Ecol. Resour.*, **14**, 166–77.
- Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M.** (2005) Acyltransferase-catalysed p- coumarate ester formation is a committed step of lignin biosynthesis. *Plant Biosyst. - An Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol.*, **139**, 50–53.
- Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M.** (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell.*, **16**, 1446-1465.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P. and Legrand, M.** (2003) Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.*, **278**, 95-103.
- Hohlfeld, M., Veit, M. and Strack, D.** (1996) Hydroxycinnamoyltransferases Involved in the Accumulation of Caffeic Acid Esters in Gametophytes and Sporophytes of *Equisetum arvense*. *Plant Physiol.*, **111**, 1153–1159.

- Hond, E. Den, Geypens, B. and Ghoois, Y.** (2000) Effect of high performance chicory inulin on constipation. *Nutr. Res.*, **20** (5), 731-736.
- Horowitz, R.M. and Gentili, B.** (1969) Taste and Structure in Phenolic Glycosides. *J. Agr. Food Chem.*, **17** (4), 696-700.
- Hu, J., Shi, X., Chen, J., Mao, X., Zhu, L., Yu, L. and Shi, J.** (2014) Alkaloids from *Toddalia asiatica* and their cytotoxic, antimicrobial and antifungal activities. *Food Chem.*, **148**, 437–444.
- Hu, Y., Gai, Y., Yin, L., Wang, X., Feng, C., Feng, L., Li, D., Jiang, X.-N. and Wang, D.-C.** (2010) Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4-coumarate:CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms. *Plant Cell.*, **22**, 3093-3104.
- Innocenti, M., Gallori, S., Giaccherini, C., Ieri, F., Vincieri, F.F. and Mulinacci, N.** (2005) Evaluation of the phenolic content in the aerial parts of different varieties of *Cichorium intybus* L. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 6497-6502.
- Iqbal, M., Ashraf, M., Jamil, A. and ur-Rehman, S.** (2006) Does seed priming induce changes in the levels of some endogenous plant hormones in hexaploid wheat plants under salt stress? *J. Integr. Plant Biol.*, **48**, 181–189.
- Islam, S.** (2006) Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf: Its potential effect on human health and nutrition. *J. Food Sci.*, **71**, 13–21.
- Jang, M. Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C. and Pezzuto J.M.** (1997) Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science (80-)*, **275**, 218–220.
- Jéandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. and Adrian, M.** (2002) Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2731–2741.
- Jones, D.H.** (1984) Phenylalanine ammonia-lyase: Regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry.*, **23** (7), 1349-1359.
- Jones, P. and Vogt, T.** (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: Tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, **213**, 164–174.
- Joosen, R.V.L., Kodde, J., Willems, L.A.J., Ligterink, W., Plas, L.H.W. Van Der and Hilhorst, H.W.M.** (2010) Germinator: A software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis* seed germination. *Plant J.*, **62**, 148-159.
- Kandeler, R. and Ullrich, W.R.** (2009) Symbolism of plants: examples from European-Mediterranean culture presents with biology and history of art: NOVEMBER: chicory. *J. Exp. Bot.*, **60** (14), 3973-3974.
- Kaul, A. and Khanduja, K.L.** (1998) Polyphenols inhibit promotional phase of tumorigenesis: relevance of superoxide radicals. *Nutr. Cancer*, **32**, 81–5.
- Kaur, C. and Kapoor, H.C.** (2001) Antioxidants in fruits and vegetables - The millennium's health. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **36**, 703–725.

- Kiers, A. (2000)** Endive, chicory and their wild relatives. A systematic and phylogenetic study of *Cichorium* (Asteraceae). *Gorteria.*, **Suppl. 5**, 1-78.
- Kim, I.A., Kim, B.-G., Kim, M. and Ahn, J.-H.** (2012) Characterization of hydroxycinnamoyltransferase from rice and its application for biological synthesis of hydroxycinnamoyl glycerols. *Phytochemistry*, **76**, 25–31.
- Kim, Y., Faqih, M.N. and Wang, S.S.** (2001) Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydr. Polym.*, **46**, 135–145.
- Klayman, D.L.** (1985) Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, **228** (4703): 1049-1055.
- Kleessen, B., Schwarz, S., Boehm, A., Fuhrmann, H., Richter, A., Henle, T. and Krueger, M.** (2007) Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. *Br. J. Nutr.*, **98**, 540-549.
- Kodama, O., Suzuki, T., Miyakawa, J. and Akatsuka, T.** (1988) Ultraviolet-induced accumulation of phytoalexins in rice leaves. *Agric. Biol. Chem.*, **52** (10), 2469-2473.
- Kojima, M. and Kondo, T.** (1985) An enzyme in sweet potato root which catalyses the conversion of chlorogenic acid, 3-caffeoylquinic acid, to isochlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2467-2469.
- Kojima, M. and Uritani, I.** (1973) Studies on chlorogenic Acid biosynthesis in sweet potato root tissue in special reference to the isolation of a chlorogenic Acid intermediate. *Plant Physiol.*, **51**, 768-771.
- Koopmann, E., Logemann, E. and Hahlbrock, K.** (1999) Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. *Plant Physiol.*, **119**, 49–56.
- Kunelius, H.T. and McRae, K.B.** (1999) Forage chicory persists in combination with cool season grasses and legumes. *Can. J. Plant Sci.*, **79**, 197-200.
- Laflamme, P., St-Pierre, B. and Luca V, De** (2001) Molecular and biochemical analysis of a Madagascar periwinkle root-specific minovincinine-19-hydroxy-O-acetyltransferase. *Plant Physiol.*, **125**, 189–198.
- Lallemand, L.A., Zubieta, C., Lee, S.G., et al.** (2012) A Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee. *Plant Physiol.*, **160**, 249-260.
- Lallemand, L.A.** (2011) Structural and biochemical characterization of enzymes involved in chlorogenic and biosynthesis. Thèse de doctorat, université de Grenoble. 198 p.
- Landry, L.G., Chapple, C.C. and Last, R.L.** (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.*, **109**, 1159–1166.
- Langenheim, J.H.** (1994) Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *J. Chem. Ecol.*, **20**, 1223–1280.

- Laplaze, L., Gherbi, H., Frutz, T., Pawlowski, K., Franche, C., Macheix, J.J., Auguy, F., Bogusz, D. and Duhoux, E.** (1999) Flavan-containing cells delimit Frankia-infected compartments in *Casuarina glauca* nodules. *Plant Physiol.*, **121**, 113–122.
- Lee, K.C., Thanigaimalai, P., Sharma, V.K., Kim, M.S., Roh, E., Hwang, B.Y., Kim, Y. and Jung, S.H.** (2010) Structural characteristics of thiosemicarbazones as inhibitors of melanogenesis. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, **20**, 6794–6796.
- Leiss, K. a, Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R. and Klinkhamer, P.G.L.** (2009) Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in chrysanthemum. *Plant Physiol.*, **150**, 1567–1575.
- Leport, L.** (1992) Accumulations de proline associées aux contraintes environnementales et à la floraison chez le colza (*Brassica napus* L.). Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, France. 260p.
- Liang, P.H., Ko, T.P. and Wang, A.H.J.** (2002) Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3339–3354.
- Limami, A., Roux, L., Laville, J. and Roux, Y.** (1993) Dynamics of Nitrogen Compounds in the Chicory (*Cichorium intybus* L.) Tuberised Tap Root during the Growing Season and Cold storage Period. *J. Plant Physiol.*, **141**, 263-268.
- Liu, Y., Liu, G., Li, Q., Liu, Y., Hou, L. and Li, G.** (2012) Influence of Pericarp, Cotyledon and Inhibitory Substances on Sharp Tooth Oak (*Quercus aliena* var. *acuteserrata*) Germination. *Plos One.*, **7** (10), 1-7.
- Liu, Y., Wang, W.L., Guo, G.X. and Ji, X.L.** (2009) Volatile emission in wheat and parasitism by *Aphidius avenae* after exogenous application of salivary enzymes of *Sitobion avenae*. *Entomol. Exp. Appl.*, **130**, 215–221.
- Long, S.R.** (2001) Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiol.*, **125**, 69–72.
- Losa, G.A.** (2003) Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur. J. Clin. Invest.*, **33**, 818–823.
- Lucchin, M., Varotto, S., Barcaccia, G. and Parrini, P.** (2008) Chicory and endive. In: Prohens, J., Nuenz, F. and Carena, M.J. eds, *Vegetables I*, vol 1. Handbook of plant breeding. Springer, New York, 3-48.
- Luna, C., García Seffino, L., Arias, C. and Taleisnik, E.** (2000) Oxidative stress indicators as selection tools for salt tolerance in *Chloris gayana*. *Plant Breed.*, **119**, 341–345.
- Lynn, D.G. and Chang, M.** (1990) Phenolic Signals in Cohabitation: Implications for Plant Development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41**, 497-526.
- Maas, E.V. and Hoffman, G.J.** (1977) Crop salt tolerance – current assessment. *J. Irr. Drain. Div. – A.S.C.E.* **103**: 115-134.

- Macheix, J.-J., Fleuriet, A. and Jay-Allemand, C.** (2005) Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*, ISBN 2880746256, 9782880746254. 84-86.
- Maeda, H. and Dudareva, N.** (2012) The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **63**, 73-105.
- Maher, E.A., Bate, N.J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R.A. and Lamb, C.J.** (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 7802-7806.
- Mai, F. and Glomb, M.A.** (2013) Isolation of phenolic compounds from iceberg lettuce and impact on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 2868–2874.
- Mansfield, J.W.** (1983) Antimicrobial compounds. In: Callow JA (ed) *Biochemical plant pathology*. 155-164.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E. and Kefalas, P.** (2005) Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.*, **89**, 411–420.
- Marschner, P.** (2012) Marschner's mineral nutrition of higher plants, third edition. DOI: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00030-3
- Marschner, H.** (1995) The mineral nutrition of higher plants. Academic press, London.
- Martinez, J. and Moreno, J.J.** (2000) Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 865–870.
- Marquès, L., Macheix, J. and Fleuriet, A.** (2005) Le brunissement enzymatique. Partie 1 : Importance des polyphénols, des polyphénol oxydases et des peroxydases. In: Les polyphénols en agroalimentaire, Cheynier, V., Sarni-Manchado, P. eds, Tec & Doc, Lavoisier, Paris.
- Masette, M., Baranga, D. and Chemurot, M.** (2015) Levels of tannins in fruit diet of grey-cheeked mangabeys (*Lophocebus ugardae*, Groves) in Lake Victoria Basin forest reserves. , **7**, 146–157.
- Mastelic, J., Politeo, O., Jerkovic, I. and Radosevic, N.** (2005) Composition and antimicrobial activity of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoid fractions. *Chem. Nat. Compd.*, **41**, 35–40.
- Mazza, C.A., Boccalandro, H.E., Giordano, C. V, Battista, D., Scopel, A.L. and Ballaré, C.L.** (2000) Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiol.*, **122**, 117-125.
- McCord, J.M. and Day, E.D.** (1978) Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.*, **86**, 139–142.
- McDougall, B., King, P.J., Wu, B.W., Hostomsky, Z., Reinecke, M.G. and Robinson, W.E.** (1998) Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 140–146.

- Menin, B., Comino, C., Moglia, A., Dolzhenko, Y., Portis, E. and Lanteri, S.** (2010) Identification and mapping of genes related to caffeoylquinic acid synthesis in *Cynara cardunculus* L. *Plant Sci.*, **179**, 338–347.
- Merillon, J.-M., Fauconneau, B., Teguo, P.W., Barrier, L., Vercauteren, J. and Huguet, F.** (1997) Antioxidant Activity of the Stilbene Astringin, Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures. *Clin. Chem.*, **43**, 1092–1093.
- Meyer, A.S., Donovan, J.L., Pearson, D. a, Waterhouse, A.L. and Frankel, E.N.** (1998) Fruit Hydroxycinnamic Acids Inhibit Human Low-Density Lipoprotein Oxidation in Vitro. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1783–1787.
- Mgbonyebi, O.P., Russo, J. and Russo, I.H.** (1998) Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *Int. J. Oncol.*, **12**, 865–874.
- Misra, N. and Dwivedi, U.N.** (2004) Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. *Plant Sci.*, **166**, 1135–1142.
- Mittler, R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, **7**, 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Breusegem, F. Van** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, **9**, 490–498.
- Mizutani, M., Ohta, D. and Sato, R.** (1997) Cinnamate 4-Hydroxylase from *Arabidopsis* and Its Expression Manner in *Planta*. *Plant Physiol.*, **113**, 755–763.
- Moco, S., Bino, R.J., Vorst, O., Verhoeven, H.A., Groot, J. de, Beek, T.A. van, Vervoort, J. and Vos, C.H.R. de** (2006) A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.*, **141**, 1205–18.
- Moco, S., Capanoglu, E., Tikunov, Y., Bino, R.J., Boyacioglu, D., Hall, R.D., Vervoort, J. and Vos, R.C.H. De** (2007) Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. *J. Exp. Bot.*, **58**, 4131–4146.
- Modafar, C. El, Clerivet, A. and Macheix, J.J.** (1996) Flavan accumulation in stems of *Platanus xacerifolia* seedlings inoculated with *Ceratocystis firnbriata* f.sp. platani, the canker stain disease agent. *Can. J. Bot.*, **74**, 1982-1987.
- Moglia, a., Lanteri, S., Comino, C., Hill, L., Kneivitt, D., Cagliero, C., Rubiolo, P., Bornemann, S. and Martin, C.** (2014) Dual Catalytic Activity of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase from Tomato Allows It to Moonlight in the Synthesis of Both Mono- and Dicafeoylquinic Acids. *Plant Physiol.*, **166**, 1777–1787.
- Moglia, A., Lanter, S., Comino, C., Acquadro, A., Vos, R. De and Beekwilder, J.** (2008) Stress-induced biosynthesis of dicafeoylquinic acids in globe artichoke. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 8641-8649.
- Molan, A.L., Duncan, A., Barry, T.N. and McNabb, W.C.** (2000) Effects of condensed tannins and sesquiterpene lactones extracted from chicory on the viability of deer lungworm larvae. *Proc. New Zeal. Soc. An.*, **60**, 26-29.

- Mulinacci, N., Innocenti, M., Gallori, S., Romani, A., Marca, G. and Vincieri, F.F.** (2001) Optimization of the chromatographic determination of polyphenols in the aerial parts of *Cichorium intybus* L. *Chromatographia.*, **54**, 455-461.
- Munns, R., Schachtman, D.P. and Condon, A.G.** (1995) the significance of a two-phase response to salinity in wheat and barley. *Aust. J. Plant Physiol.*, **22** (4), 561-569.
- Munns, R. and Sharp, R.E.** (1993) Involvement of abscisic acid in controlling plant growth in soil of low water potential. *Aust. J. Plant Physiol.*, **20** (5), 425-437.
- Munns, R.** (1993) Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses. *Plant. Cell Environ.*, **16**, 15–24.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473–497.
- Murphy, J.D. and McCarthy, K.** (2005) Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. *Appl. Energy*, **82**, 148–166.
- Murthy, H.N., Lee, E.J. and Paek, K.Y.** (2014) Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, **118**, 1-16.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.-J. and Aubert, S.Y.** (2009) Enzymatic browning reactions in apple products. *Food Science and Nutrition.*, **34**, 109-157.
- Niggeweg, R., Michael, A.J. and Martin, C.** (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 746-754.
- Noble, a. C.** (1994) Bitterness in wine. *Physiol. Behav.*, **56**, 1251–1255.
- Noctor, G. and Foyer, C.H.** (1998) ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 249–279.
- Nørbæk, R., Nielsen, K. and Kondo, T.** (2002) Anthocyanins from flowers of *Cichorium intybus*. *Phytochemistry*, **60**, 357–359.
- Ozeki, Y. and Komamine, A.** (1985) Changes in Activities of Enzymes Involved in General Phenylpropanoid Metabolism during the Induction and Reduction of Anthocyanin Synthesis in a Carrot Suspension Culture as Regulated by 2, 4-D . *Plant Cell Physiol.*, **26** (5), 903–911.
- Papetti, A., Daglia, M., Aceti, C., Sordelli, B., Spini, V., Carazzone, C. and Gazzani, G.** (2008) Hydroxycinnamic acid derivatives occurring in *Cichorium endivia* vegetables. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, 472–476.
- Passioura, J.B. and Munns, R.** (2000) Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Aust. J. Plant Physiol.*, **27** (10): 941-948.
- Pellissier, F.** (1994) Effect of phenolic compounds in humus on the natural regeneration of spruce. *Phytochemistry.*, **36** (4), 865-867.

- Peltzer, D., Dreyer, E. and Polle, A.** (2002) Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes in two contrasting species: *Fagus sylvatica* and *Coleus blumei*. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**, 141–150.
- Peluso, G., Feo, V. De, Simone, F. De, Bresciano, E. and Vuotto, M.L.** (1995) Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. *J. Nat. Prod.*, **58**, 639–646.
- Perry, N.B., Burgess, E.J. and Glennie, V. leAnne** (2001) Echinacea Standardization: Analytical Methods for Phenolic Compounds and Typical Levels in Medicinal Species. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1702–1706.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., et al.** (2009) Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry.*, **70**, 1663-1679.
- Pfaffl, M.W.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29** (9), 45e.
- Pichersky, E. and Gershenzon, J.** (2002) The formation and function of plant volatiles: Perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 237–243.
- Pichersky, E., Raguso, R.A., Lewinsohn, E. and Croteau, R.** (1994) Floral scent production in *Clarkia* (*Onagraceae*). *Plant physiol.*, **106**, 1533-1540.
- Pool-Zobel, B.L.** (2005) Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br. J. Nutr.*, **93 Suppl 1**, 73–90.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. and Pouységou, L.** (2011) Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **50**, 586–621.
- Raheem, K.S., Botting, N.P., Williamson, G. and Barron, D.** (2011) Total synthesis of 3,5-O-dicaffeoylquinic acid and its derivatives. *Tetrahedron Lett.*, **52**, 7175-7177.
- Rameau, J.C., Mansion, D. and Dumé, G.** (1989) Flore forestière française 1 plaines et collines. Paris: IDF. 1785 pp.
- Rautengarten, C., Baidoo, E., Keasling, J.D. and Scheller, H.V.** (2010) A simple method for enzymatic synthesis of unlabeled and radiolabeled hydroxycinnamate-CoA. *Bioenergy Res.*, **3**, 115-122.
- Rees, S.B. and Harborne, J.B.** (1985) The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry.*, **24** (10), 2225-2231
- Reigosa, M.J., Souto, X.C. and González, L.** (1999) Effect of phenolic compounds on the germination of six weeds species. *Plant Growth Regul.*, **28**, 83-88.
- Rhijn, P. van and Vanderleyden, J.** (1995) The Rhizobium -Plant Symbiosis. *Microbiol. Rev.*, **59**, 124–142.

- Rhoades, D.F.** (1979) Evolution of plant chemical defense against herbivores. *In: Herbivores: their interactions with plant secondary metabolites.* Rosenthal, G.A., Janzen, D.H. eds. Academic press. 3-54.
- Rice-Evans, C., Miller, N. and Paganga, G.** (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, **2** (4), 152-159.
- Ripoll, C., Schmidt, B., Ilic, N., Raskin, I.** (2006) *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of a sesquiterpene lactone extract from chicory (*Cichorium intybus* L.). *Eur. Patent EP1962875*. Data issued: 2008.09.03 2006.
- Ro, D.K., Mah, N., Ellis, B.E. and Douglas, C.J.** (2001) Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol.*, **126**, 317–329.
- Robertfroid, M.B., Cumps, J. and Devogelaer, J.P.** (2002) Dietary chicory inulin increases whole-body bone mineral density in growing male rats. *J. Nutr.*, **132** (12) 3599-3602.
- Robinson, W.E.** (1998) L-chicoric acid, an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase, improves on the *in vitro* anti-HIV-1 effect of Zidovudine plus a protease inhibitor (AG1350). *Antiviral Res.*, **39**, 101-111.
- Roepstorff, A., Mejer, H., Thomsen, L.E., Thamsborg, S.M., Byrne, D.V., Lydehøj Hansen, L., Bach Knudsen, K.E. and Møller, K.** (2005) Chicory roots improves the taste and odour of organic pork. *Darcofenews n° 3*.
- Rösler, J., Krekel, F., Amrhein, N. and Schmid, J.** (1997) Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.*, **113**, 175-179.
- Rumball, W., Skipp, R.A., Keogh, R.G. and Claydon, & R.B.** (2003) “Puna II” forage chicory (*Cichorium intybus* L.). *New Zeal. J. Agric. Res.*, **46**, 53–55.
- Rumball, W.** (1986) ‘Grasslands Puna’ chicory (*Cichorium intybus* L.). *New Zeal. J. Exp. Agr.*, **14**(1), 105-107.
- Salem, J.H., Humeau, C., Chevalot, I., Harscoat-Schiavo, C., Vanderesse, R., Blanchard, F. and Fick, M.** (2010) Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. *Process Biochem.*, **45**, 382–389.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edition. 2nd Edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson, M.A., Labreveux, M., Hall, M.H. and Elwinger, G.F.** (2003) Nutritive value of chicory and english plantain forage. *Crop Sci.*, **43** (5), 1797-1804.
- Saure, M.C.** (1990) External control of anthocyanin formation in apple. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, **42**, 181-218.
- Scalbert, A.** (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**, 3875–3883.

- Scandalios, J.G.** (1993) Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiol.*, **101**, 7–12.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P. and Werck-Reichhart, D.** (2001) CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* Is a 3'-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. *J. Biol. Chem.*, **276** (39), 36566–36574.
- Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F.L., Kaaij, R.M. Van der and Kan, J. a L. Van** (2002) Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Mol. Microbiol.*, **43**, 883–894.
- Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R. and Schieber, A.** (2004) Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSn. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4090–4096.
- Shabala, S. and Munns, R.** (2012) Salinity stress: physiological constraints and adaptive mechanisms. In: *Plant stress physiology*. Shabala, S. ed. CAB International. 59–93.
- Shabala, S. and Cuin, T. a.** (2008) Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol. Plant.*, **133**, 651–669.
- Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., et al.** (2003) Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/Citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiol.*, **131**, 1868–1876.
- Shannon, M.C. and Grieve, C.M.** (1998) Tolerance of vegetable crops to salinity. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, **78**, 5–38.
- Shirley, A.M. and Chapple, C.** (2003) Biochemical characterization of sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase, a serine carboxypeptidase-like protein that functions as an acyltransferase in plant secondary metabolism. *J. Biol. Chem.*, **278** (22), 19870–19877.
- Short, L., Thoms, A. V, Cao, B., Sinyukov, A.M., Joshi, A., Sanders, V. and Voronine, D. V** (2015) Facile residue analysis of recent and prehistoric cook-stones using handheld Raman spectrometry. *J. Raman Spectrosc.*, **46**, 126–132.
- Shufflebottom, D., Edwards, K., Schuch, W. and Bevan, M.** (1993) Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *Plant J.*, **3**, 835–845.
- Singleton, V.L., Zaya, J. and Trousdale, E.K.** (1986) Caffeoyl and coumaroyl acids in fruit of *Vitis*. *Phytochemistry*, **25**, 2127–2133.
- Singleton, V.L., Timberlake, C.F. and Lea, A.G.H.** (1978) The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 403–410.
- Sinkovič, L., Hribar, J. and Vidrih, R.** (2014) Influence of Cultivar and Storage of Chicory (*Cichorium intybus* L.) Plants on Polyphenol Composition and Antioxidative Potential. *Czech J. Food Sci.*, **32**, 10–15.

- Siwinska, J., Kadzinski, L., Banasiuk, R., Gwizdek-Wisniewska, A., Olry, A., Banecki, B., Lojkowska, E. and Ilnatowicz, A.** (2014) Identification of QTLs affecting scopolin and scopoletin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.*, **14**, 280.
- Slanina, J., Táborská, E., Bochořáková, H., Slaninová, I., Humpa, O., Robinson, W.E. and Schram, K.H.** (2001) New and facile method of preparation of the anti-HIV-1 agent, 1,3-dicaffeoylquinic acid. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3383–3385.
- Smith, a. H., Gill, W.M., Pinkard, E. a. and Mohammed, C.L.** (2007) Anatomical and histochemical defence responses induced in juvenile leaves of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens* by *Mycosphaerella* infection. *For. Pathol.*, **37**, 361–373.
- Sonnante, G., D'Amore, R., Blanco, E., Pierri, C.L., Palma, M. De, Luo, J., Tucci, M. and Martin, C.** (2010) Novel hydroxycinnamoyl-coenzyme A quinate transferase genes from artichoke are involved in the synthesis of chlorogenic acid. *Plant Physiol.*, **153**, 1224-1238.
- Southerton, S.G. and Deverall, B.J.** (1990) Histochemical and chemical evidence for lignin accumulation during the expression of resistance to leaf rust fungi in wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **36**, 483-494.
- Stadtman, E.R. and Chock, P.B.** (1992) From metabolite, to metabolism, to metabolon: current topics, 1st edition. Academic Press. 458p.
- Steinberg, D.** (1988) Metabolism of lipoproteins and their role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atheroscler. Rev.*, **18**, 1-6.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.M. and Luca, V. De** (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.*, **14** (6), 703-713.
- St-Pierre, B. and Luca, V. De** (2000) Chapter Nine Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification fo the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Recent Adv. Phytochem.* 34. Edited by Romeo, J., Ibrahi, R., Varin, L. and De Luca, V. Elsevier Science, Ltd., **2000**, 285-315.
- Sullivan, M.** (2009) A novel red clover hydroxycinnamoyl transferase has enzymatic activities consistent with a role in phaselic acid biosynthesis. *Plant Physiol.*, **150**, 1866–1879.
- Sullivan, M.L.** (2014) Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) leaves contain hydroxycinnamoyl-CoA:tartaric acid hydroxycinnamoyl transferase activity and accumulate hydroxycinnamoyl-tartaric acid esters. *Planta*, **239**, 1091–1100.
- Sullivan, M.L. and Foster, J.L.** (2013) Perennial peanut (*Arachis glabrata* Benth.) contains polyphenol oxidase (PPO) and PPO substrates that can reduce post-harvest proteolysis. *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 2421–2428.
- Sullivan, M.L. and Zarnowski, R.** (2011) Red clover HCT2, a hydroxycinnamoyl-coenzyme A:malate hydroxycinnamoyl transferase, plays a crucial role in biosynthesis of phaselic acid and other hydroxycinnamoyl-malate esters in vivo. *Plant Physiol.*, **155**, 1060-1067.

- Sumithra, K., Jutur, P.P., Carmel, B.D. and Reddy, A.R.** (2006) Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: Responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regul.*, **50**, 11–22.
- Suzuki, H., Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Fukui, Y., Nakamura, N., Yamaguchi, M.-A., Tanaka, Y., Kusumi, T. and Nishino, T.** (2002) cDNA cloning, heterologous expressions, and functional characterization of malonyl-coenzyme a:anthocyanidin 3-o-glucoside-6"-o-malonyltransferase from dahlia flowers. *Plant Physiol.*, **130**, 2142-2151.
- Tabet, N., Mantle, D., Walker, Z. and Orrell, M.** (2002) Endogenous antioxidant activities in relation to concurrent vitamins A, C and E intake in *Dementia*. *Int. J. Psychogeriatrics.*, **14** (1), 7-15.
- Taguchi, G., Shitchi, Y., Shirasawa, S., Yamamoto, H. and Hayashida, N.** (2005) Molecular cloning, characterization, and downregulation of an acyltransferase that catalyzes the malonylation of flavonoid and naphthol glucosides in tobacco cells. *Plant J.*, **42**, 481–91.
- Taguchi, G., Fujikawa, S., Yazawa, T., Kodaira, R., Hayashida, N., Shimosaka, M. and Okazaki, M.** (2000) Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Sci.*, **151**, 153–161.
- Takaoka M.** (1939). On the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes fil.). *Journal of Chem. Society Japan*, **60**, 1261-1264
- Taylor, A.** (2009) Functional genomics of photoperiodic bulb initiation in onion (*Allium cepa*). Thèse de doctorat, University of Warwick, United Kingdom. 237p.
- Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, a, Stoltz, C., Garnier, J.M., Jeltsch, J.M., Durst, F. and Werck-Reichhart, D.** (1993) Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 4102–4106.
- Teutschbein, J., Gross, W., Nimtz, M., Milkowski, C., Hause, B. and Strack, D.** (2010) Identification and localization of a lipase-like acyltransferase in phenylpropanoid metabolism of tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Biol. Chem.*, **285**, 38374–38381.
- Thormann, M.N., Currah, R.S. and Bayley, S.E.** (2002) The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. *Can. J. Microbiol.*, **48**, 204-211.
- Troll W., L.J.** (1955) A photometric method for the of proline. *J. biol. Chem.*, **215**, 655–660.
- Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S.A., Schröder, J. and Schröder, G.** (1994) Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J. Mol. Evol.*, **38**, 610-618.
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E. and Khanizadeh, S.** (2005) Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4989-4995.
- Tugwell, S. and Branch, G.M.** (1989) Differential polyphenolic distribution among tissues in the kelps *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida* and *Macrocystis angustifolia* in relation to plant-defence theory. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, **129**, 219-230.

- Tuominen, L.K., Johnson, V.E. and Tsai, C.-J.** (2011) Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogues. *BMC Genomics.*, **12**, 236.
- Turner, L.B., Mueller-Harvey, I. and McAllan, A.B.** (1993) Light-induced isomerization and dimerization of cinnamic acid derivatives in cell walls. *Phytochemistry*, **33**, 791–796.
- Turrens, J.F.** (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, **592** (2), 335-344.
- Tursunay, D., Muradil, K. and Abdulla, A.** (2009) Antimicrobial activities of ethanol extract from *Cichorium intybus* L. stems. *Food Sci.*, **30**, 80-82.
- Udvardi, M.K., Czechowski, T. and Scheible, W.-R.** (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, **20**, 1736–1737.
- Vagelos, P.R., Alberts, A.W. and Martin, D.B.** (1962) Activation of acetyl-CoA carboxylase and associated alteration of sedimentation characteristics of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **8** (1), 4-8.
- Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. and Thomas, G.** (2003) Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) - Differential response in salt-tolerant and sensitive varieties. *Plant Sci.*, **165**, 1411–1418.
- Vanholme, R., Cesarino, I., Rataj, K., Xiao, Y., Sundin, L., Goeminne, G., Kim, H., Cross, J., Morreel, K., Araujo, P., Welsh, L., Haustraete, J., McClellan, C., Vanholme, B., Ralph, J., Simpson, G.G., Halpin, C. and Boerjan, W.** (2013) Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway. *Science* **6**, **341** (6150), 1103-1106.
- Vanholme, R., Ralph, J., Akiyama, T., et al.** (2010) Engineering traditional monolignols out of lignin by concomitant up-regulation of F5H1 and down-regulation of COMT in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **64**, 885–897.
- Varga, M. and Köves, E.** (1959) Phenolic acids as growth and germination inhibitors in dry fruits. *Nature*, **183** (4658), 401.
- Vasconcelos, M. do C.B.M. de, Bennett, R.N., Quideau, S., Jacquet, R., Rosa, E.A.S. and Ferreira-Cardoso, J. V.** (2010) Evaluating the potential of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) fruit pericarp and integument as a source of tocopherols, pigments and polyphenols. *Ind. Crops Prod.*, **31**, 301-311.
- Verraest, D.L., Peters, J. a., Bekkum, H. Van and Rosmalen, G.M. Van** (1996) Carboxymethyl Inulin: A New Inhibitor for Calcium Carbonate Precipitation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 55–62.
- Villegas, R.J.A., Shimokawa, T., Okuyama, H. and Kojima, M.** (1987) Purification and characterization of chlorogenic acid: Chlorogenate caffeoyl transferase in sweet potato roots. *Phytochemistry.*, **26**, 1577-1581.
- Vranová, E., Coman, D. and Gruissem, W.** (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **64**, 665–700.

- Wang, M., Simon, J.E., Aviles, I.F., He, K., Zheng, Q.Y. and Tadmor, Y.** (2003) Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 601–608.
- Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P. and McPhail, a T.** (1971) Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325–2327.
- Wasternack, C. and Hause, B.** (2013) Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany. Ann. Bot.*, **111**, 1153-1159.
- Whetten, R.W., MacKay, J.J. and Sederoff, R.R.** (1998) Recent Advances in Understanding Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 585–609.
- Wiele, T. Van De, Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H. and Verstraete, W.** (2004) Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **51**, 143-153.
- Wijeratne, S.S.K., Cuppett, S.L. and Schlegel, V.** (2005) Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 Human colon cells. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 8768-8774.
- Willeman, H., Hance, P., Fertin, A., Voedts, N., Duhal, N., Goossens, J. and Hilbert, J.** (2014) A Method for the Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Sesquiterpene Lactone Content in Industrial Chicory Root Foodstuffs. *Sci. World J.*, **2014**, 1-11.
- Wink, M.** (2011) *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews*, 2nd edition. volume 40.
- Wink, M.** (1997) Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Adv. Bot. Res.*, **25**, 141-169.
- Wu, C.H., Murthy, H.N., Hahn, E.J. and Paek, K.Y.** (2007) Large-scale cultivation of adventitious roots of *Echinacea purpurea* in airlift bioreactors for the production of chichoric acid, chlorogenic acid and caftaric acid. *Biotechnol. Lett.*, **29**, 1179–1182.
- Xiong, L. and Zhu, J.-K.** (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant. Cell Environ.*, **25**, 131–139.
- Yamahara, J., Mochizuki, M., Rong, H.Q., Matsuda, H. and Fujimura, H.** (1983) The anti-ulcer effect in rats of ginger constituents. *J. Ethnopharmacol.*, **23**, 299–304.
- Yang, D., Mei, W., Wang, H. and Dai, H.** (2010) Antimicrobial Alkaloids from the Tubers of *Stephania succifera*. *Z. Natuforsch.*, **65** (6), 757-761.
- Yu, X.H., Gou, J.Y. and Liu, C.J.** (2009) BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: Bioinformatics and gene expression. *Plant Mol. Biol.*, **70**, 421–442.

Zawirska-Wojtasiak, R., Wojtowicz, E., Przygoński, K. and Olkowicz, M. (2014) Chlorogenic acid in raw materials for the production of chicory coffee. *J. Sci. Food Agric.*, **94**, 2118–2123.

ANNEXES

Composition du milieu de culture Murashige & Skoog**Macro-éléments**

KH_2PO_4	1,25 mM
$\text{NH}_4.\text{NO}_3$	20,61 mM
KNO_3	18,79 mM
$\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$	1,50 mM
CaCl_2	2,99 mM

Micro-éléments

$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,11 μM
$\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$	0,10 μM
FeNaEDTA	0,10 mM
H_3BO_3	0,10 mM
KI	5 μM
$\text{MnSO}_4,\text{H}_2\text{O}$	0,10 mM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4,2\text{H}_2\text{O}$	1,03 μM
$\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$	29,91 μM
MES	4,69 mM

pH ajusté à 6 avec du KOH

Publication

Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus*

Marianne Delporte, Guillaume Legrand, Jean-Louis Hilbert, David Gagneul

1 **Selection and validation of reference genes for quantitative real-**
2 **time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus*.**

3 **Marianne Delporte, Guillaume Legrand, Jean-Louis Hilbert, David Gagneul***
4 **Charles Viollette Research Institute, University Lille1, Villeneuve d'Ascq, France**

5 * **Correspondence:** Dr. David Gagneul, Charles Viollette Research Institute, University
6 Lille1, Avenue Mendeleiev, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.
7 E-mail: David.Gagneul@univ-lille1.fr (DG)

8 **Keywords:** gene expression, normalization, cell culture, specialized metabolism,
9 phenylpropanoids, methyljasmonate.

10 **Abstract**

11 Plant polyphenols represent a huge reservoir of bioactive compounds. Industrial chicory, an
12 important crop from northwestern Europe, accumulates an original combination of such
13 compounds i.e. chlorogenic, isochlorogenic, caftaric and chicoric acids arising from the
14 phenylpropanoid pathway. For a complete understanding of these biochemical pathways,
15 analyses of gene expression using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) should be
16 considered. Because cell cultures are a model of choice for secondary metabolism
17 investigations, this study described for the first time the validation of reference genes for this
18 system in chicory. Eighteen potential reference genes were obtained by mining expressed
19 sequence tag databases of chicory for orthologs of *Arabidopsis thaliana* genes currently used
20 as reference genes. Twelve genes passed the qRT-PCR standard requirements and their
21 expression stability across different samples was tested using three distinct softwares:
22 geNorm, NormFinder and BestKeeper. In cell cultures grown under various conditions, *TIP41*
23 (*TIP41* like protein) was shown to be the most stable gene. Further validation of the proposed
24 reference genes was done by normalization of expression levels of a group of genes of
25 interest. In order to assess the potentiality of the proposed list of candidate reference genes,
26 these genes were in parallel tested on another experimental design i.e. chicory seedlings. In
27 this case, the best reference gene identified was *Clath* (Clathrin adaptator complex subunit).
28 The results highlight the importance of the use of properly validated reference genes to
29 achieve relevant interpretation of qRT-PCR analyses. Here, we provide a list of reference
30 genes suitable for future gene expression studies in chicory.

31 **1 Introduction**

32 Plant specialized metabolites, also known as secondary metabolites in opposition to so called
33 primary metabolites, represent a huge reserve of bioactive compounds amenable for a wide
34 range of human applications. Among them, polyphenols are particularly desirable in food
35 crops due to their numerous health benefits notably because of their antioxidant properties
36 (Scalbert et al., 2005). Industrial chicory (*Cichorium intybus* L. var *sativum*) is a member of
37 the *Asteraceae* family widely used for inulin production in northwestern Europe, India, South
38 Africa and Chile (Street et al., 2013). Its roots are also processed to prepare dried or roasted
39 products or beverages. Chicory, an important crop in the region Nord-Pas-de-Calais, France,
40 accumulates four major polyphenols: chlorogenic, isochlorogenic, caffeic and chicoric acids
41 (Carazzone et al., 2013). These caffeic esters have been described for their antioxidant
42 properties and also for potential therapeutic properties such as antidiabetic properties
43 (Heimler et al., 2009; Tousch et al., 2008; Pushparaj et al., 2007). The biochemical pathways
44 involved in the synthesis of these high-value bioactive compounds are far from being fully
45 understood. Nevertheless, biochemical data indicate that they all arise from the
46 phenylpropanoid pathway. Furthermore the precise regulation mechanisms controlling the
47 synthesis of the four compounds highly interconnected at the metabolic level still need to be
48 described. To get more insight into these pathways, high throughput gene expression analyses
49 should be considered, and assessed by fluorescence-based quantitative real-time PCR (qRT-
50 PCR) as a method of choice for accurate quantification of gene expression. Nevertheless
51 several critical steps have to be followed in order to provide meaningful data. In particular
52 identification of reference genes is a critical step in the design of qRT-PCR experiments.
53 They are crucial for data normalization and will determine the reliability of the data and of
54 their interpretation (Bustin et al., 2009). Good reference genes are stably expressed under
55 chosen experimental conditions and should have a level of expression comparable to those of
56 the target genes (Huang et al., 2014; Gimeno et al., 2014). The key difference between a
57 reference gene and a real housekeeping gene is that a housekeeping gene should be stably
58 expressed whatever the conditions, at every stage of the plant life, in every tissues. If such a
59 gene existed, then no validation would be required. However, some genes as genes encoding
60 GADPH or actin were sometimes inappropriately referred to as housekeeping gene. For
61 example, *GADPH* is unstably expressed in papaya during storage at different temperature or
62 under nitrogen stress in tomato and actin is unstably expressed under salinity stress in potato
63 or in cucumber (Zhu et al., 2012; Løvdal and Lillo, 2009; Nicot et al., 2005; Wan et al.,
64 2010). Therefore, it appears more appropriate to talk about reference genes rather than
65 housekeeping genes.

66 In an attempt to decipher the phenylpropanoid pathway in chicory, we have established cell
67 cultures from chicory roots. Due to their genetic stability and to their well-controlled culture
68 conditions, cell cultures are a suitable model for secondary metabolism investigation (Collin,
69 2001; Hussain et al., 2012). Although reference genes have already been described for chicory
70 plant, none has been assessed for cell suspension cultures (Maroufi et al., 2010). As a proof of
71 principle, Methyl jasmonate (MeJA), known as an inducer of jasmonate metabolism and to
72 regulate a set of physiological and developmental processes, was chosen to elicit cell
73 suspension. Particularly, MeJA was shown to stimulate secondary metabolite production in

74 plant cell cultures such as phenylpropanoid metabolism in *Nicotiana tabacum* cells (Gális et
75 al., 2006). We have shown that chlorogenic and isochlorogenic acid accumulations were
76 promoted by such a treatment in chicory cell cultures (unpublished results). Several studies
77 have shed light on some mechanisms of the MeJA-elicited secondary metabolites biosynthesis
78 (Wasternack and Hause, 2013; De Geyter et al., 2012). Nevertheless the detailed processes of
79 MeJA stimulation of caffeic ester production and concomitant transcriptome changes
80 associated with response to MeJA remain poorly understood.

81 In the current study, eighteen genes were tested as potential candidates for the normalization
82 of qRT-PCR data from chicory cell cultures exposed to various conditions of elicitation.
83 These genes were also tested on another study design, *i.e.* different organs of six-week old
84 seedlings, in order to assess their potentiality under a variety of experimental conditions.
85 Finally, twelve genes were ranked according to three of the most used softwares *i.e.* geNorm,
86 Normfinder and BestKeeper and reference genes suitable for data normalization were
87 identified for both cell cultures and seedlings. Furthermore, the usefulness of these reference
88 genes was tested by normalizing expression of some genes of interest (GOI) known to be
89 induced by MeJA treatment in other plant species *i.e.* *AOC*, *MYC2*, *C4H*, *PAL* and *4CL*.

90 2 Material and methods

91 2.1 Plant material

92 Experiments were conducted with *Cichorium intybus* L. var *sativum* cv. Orchies. *C. intybus*
93 plants were germinated from seeds originally received from the company Florimond Desprez
94 (Cappelle en Pèvele, France). Cell suspension cultures of *C. intybus* were obtained from root
95 explant derived callus. The cultures were maintained in a liquid Murashige and Skoog
96 medium (MS) (Murashige and Skoog, 1962) containing sucrose (20 g.L⁻¹), glutamine (500
97 mg.L⁻¹), inositol (100 mg.L⁻¹), naphthalene acetic acid (1.8 mg.L⁻¹), kinetin (0.02 mg.L⁻¹) and
98 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (0.02 mg.L⁻¹) in Erlenmeyer flasks on orbital shaker at an
99 agitation speed of 110 rpm with a light source providing about 5 W.m⁻² on a 12/12-h
100 light/dark cycle with a temperature of 24 ± 1°C in the light phase and 20 ± 1°C in the dark
101 phase. Elicitation experiments were conducted in triplicates on 20 mL subcultures seeded
102 with about 1 g of fresh cells in 50 mL Erlenmeyer flasks. Then, MeJA dissolved in ethanol
103 was added to a final concentration of 50 µM to elicit cells. As negative controls, cells kept in
104 the reference medium alone or with ethanol added were used. Cells were harvested 24 h after
105 the beginning of the experiment by vacuum filtration and rinsed with MS medium. Collected
106 cells were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Cells harvested before
107 elicitation constitute another control. For experiments with seedlings, seeds of *C. intybus* were
108 sown on filter paper impregnated with liquid MS medium 0.5X for 7 days (Murashige and
109 Skoog, 1962). Seedlings were then transferred and grown hydroponically on the same
110 medium for 6 weeks in a greenhouse on a 16/8-h light/dark cycle with a temperature of 24 ±
111 1°C in the light phase and 18 ± 1°C in the dark phase. Then, three young plants were
112 individually dissected and sampled in four parts: root and leaves sorted by age. At this stage,
113 six to eight leaves have emerged and so, leaves were separated in three equivalent groups i.e.
114 oldest leaves, middle-age leaves and the remaining partially expanded leaves. The samples
115 were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

116 2.2 RNA extraction and cDNA synthesis

117 Total RNA was extracted from cell cultures using Tri-Reagent (MRC, Inc) according to the
118 manufacturer's instructions. To avoid genomic DNA contamination, DNase treatment was
119 performed using the Turbo DNA-Free Kit (Applied Biosystem). Total RNA from seedlings
120 tissues was extracted using the Nucleospin RNA Kit (Macherey-Nagel) including a DNase
121 treatment. For both cell cultures and seedlings, RNA concentration, quality and purity were
122 determined using the Experion Automated Electrophoresis System (Bio-rad). cDNA was
123 synthesized from 1 µg of total RNA with the Reverse Transcriptase Superscript III RNase H
124 kit (Invitrogen) and oligo(dT)₂₀ primer (Invitrogen), according to the manufacturer's
125 instruction in a final volume of 21 µL.

126 2.3 Primer design

127 The qRT-PCR primers were designed using Primer 3 with the following parameters: T_m
128 between 59 and 61°C (optimum T_m of 60°C); 18-25 base pairs (bp) in length with the
129 optimum length at 20 bp; GC content of 40-60% and a PCR product size between 60 and 150

130 bp. To check the primer's specificity, conventional PCR was performed and the products
 131 analyzed by electrophoresis on 1.0% agarose gels stained using GelRed (Biotium). For both
 132 candidate reference genes and genes of interest (GOI), chicory sequences were retrieved after
 133 performing BLASTX searches with orthologous gene sequences of Arabidopsis as template.
 134 The database used was an expressed sequence tag (EST) database of a cDNA library derived
 135 from chicory roots produced using the Roche 454 sequencing platform.

136 2.4 qRT-PCR conditions and analysis

137 The qRT-PCR were carried out in 96-wells plates with the iCycler iQ real time PCR detection
 138 system (Bio-Rad) using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a reaction volume of 20 μ L
 139 containing 10 μ L 2X iQ SYBR Green Supermix, 5 μ L qRT-PCR template diluted
 140 appropriately and 1.5 μ L of primer (5 μ M). The cycling conditions were as recommended by
 141 the manufacturer: 3 min at 95°C preceding 40 cycles (10 s at 95°C followed by 30 s at 60°C).
 142 At the end of the run, a melting curve was generated by heating the amplicon from 60 to 95°C
 143 in order to confirm the specificity of the amplification for each primer pair. To check the
 144 absence of contamination by genomic DNA, PCR reactions on RNA templates were
 145 performed for each primer pair. All qRT-PCR were run in technical duplicates and biological
 146 triplicates. Standard curves were generated to calculate the PCR efficiency using a five-fold
 147 dilution series of a pooled sample containing an equal fraction of all cDNAs of the
 148 experiment. Efficiency (E) of each primer pair was obtained from the slope of the calibration
 149 curve generated according to the equation:

$$150 E = (10^{\frac{-1}{\text{slope}}} - 1) \times 100 \text{ (Bustin et al., 2009).}$$

151 Primers associated with amplification efficiency below 90% and above 110% were not
 152 considered.

153 2.5 Statistical analysis of the reference gene expression stability

154 Expression levels were determined as the number of cycles needed for the fluorescent signal
 155 to reach a threshold fixed in the exponential phase of the PCR reaction (Ct). Three different
 156 statistical algorithms were used to evaluate the stability of the reference genes: geNorm
 157 (Vandesompele et al., 2002), NormFinder (Andersen et al., 2004) and BestKeeper (Pfaffl et
 158 al., 2004). Ct values were converted into correct input files according to the requirement of
 159 the softwares.

160 2.6 Determination of the expression profile of GOI

161 In order to validate the reliability of the selected reference genes, relative quantification (Q)
 162 of some genes known to be induced by MeJA was realized. The expression levels were
 163 calculated according to the Pfaffl equation:

$$164 Q = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}} \text{ (Pfaffl, 2001).}$$

165 E_{target} is the real-time PCR efficiency of target gene transcript; E_{ref} is the real-time PCR
 166 E_{target} is the real-time PCR efficiency of target gene transcript; E_{ref} is the real-time PCR efficiency of

167 reference gene transcript; ΔC_t is the C_t deviation of control minus sample of the gene
168 transcript.
169 ANalysis Of VAriance were conducted with the R software with a cut-off value of 0.05 (R
170 Core Team, 2014).

171 3 Results

172 3.1 Selection of candidate reference genes, design of primers, and evaluation of primer 173 specificity and PCR efficiency

174 Eighteen candidate genes were chosen according to described Arabidopsis most stable genes
175 and reference genes commonly used in qRT-PCR studies (Czechowski et al., 2005).
176 Orthologous chicory sequences were retrieved after performing BLASTX on a chicory root
177 EST database. These eighteen genes listed in Table 1 were named according to Arabidopsis
178 orthologs. The putative reference genes encode proteins with a wide variety of biological
179 functions such as transcription factors, ubiquitous enzymes or cytoskeleton elements. The
180 primer sequences, amplicon melting temperature (T_m) and length and PCR efficiencies are
181 indicated in Table 2.

182 Twelve candidate reference genes were selected on the basis of the amplification efficiency
183 and primer specificity but also on the basis of their mean C_t value. Indeed, it's preferable to
184 use reference gene with a C_t value similar to C_t value of the GOI. Thus, genes with a too low
185 or too high C_t value in our conditions like *EF1 α* (mean C_t of 14) or *TUB β* (mean C_t of 31)
186 were discarded even if they are often used as reference genes.

187 Table 1: Description of candidate reference genes, genes of interest, and comparison
 188 with *Arabidopsis* orthologs

Gene abbreviation	Accession number	Gene description	Arabidopsis ortholog	Arabidopsis blastX E-value
<i>UBQ10</i>	KP752078	Ubiquitin 10	At4g05320	6.00E-150
<i>EF1α</i>	KP752079	Elongation Factor 1- α	At5g60390	0
<i>GAPDH</i>	DT210806.1	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	At1g13440	7.00E-172
<i>UBC9</i>	FL679405.1	Ubiquitin conjugating enzyme 9	At4g27960	7.00E-84
<i>ACT2</i>	KP752080	Actin 2	At3g18780	1.00E-31
<i>TIP41</i>	EH681285.1	TIP41 like protein	At4g34270	9.00E-105
<i>UBC</i>	EH709287.1	Ubiquitin-conjugating enzyme	At5g25760	8.00E-88
<i>PP2AA3</i>	EH675923.1	Protein phosphatase 2A subunit A3	At1g13320	1.00E-48
<i>bHLH</i>	KP752081	Transcription factor bHLH	At4g38070	5.00E-29
<i>CYP5</i>	EH688850.1	Cyclophilin 5	At2g29960	3.00E-78
<i>PROF</i>	DT2111339.1	Profilin	At2g19760	5.00E-57
<i>TUB β9</i>	KP752082	Tubulin β -9	At4g20890	8.00E-87
<i>SAND</i>	KP752083	SAND family protein	At2g28390	0
<i>Clath</i>	EH684142.1	Clathrin adaptor complex subunit	At5g46630	0
<i>ACT7</i>	EH674624.1	Actin 7	At5g09810	0
<i>PP2AA2</i>	FL675704.1	Protein phosphatase 2A subunit A2	At3g25800	0
<i>αTUB</i>	EH691312.1	Tubulin α	At5g19780	0
<i>βTUB</i>	KP752084	Tubulin β -3	At5g62700	0
<i>AOC</i>	EH704455.1	Allene oxide cyclase	At1g13280	4.00E-60
<i>MYC2</i>	KP752085	Transcription factor MYC2	At1g32640	3.00E-150
<i>PAL</i>	KP752086	Phe ammonia-lyase	At2g37040	0
<i>C4H</i>	KP752087	Cinnamate 4-hydroxylase	At2g30490	0
<i>4CL</i>	EH704637.1	4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase	At1g51680	0

189 Table 2: Primer sequences used for amplification of reference genes and genes of
 190 interest, amplicon length, melting temperature and PCR efficiency. The genes discarded
 191 from the stability analyses are underlined. Gene abbreviations are explained in Table 1.

Gene abbreviation	Primer sequence (Forward/Reverse primer)	Amplicon length	T _m	Efficiency
<i>ACT7</i>	5'-AGACAACACGGCCTGGATAG-3' 5'-TGAAGAGCACCCGGTTTTAC-3'	130 bp	81°C	104 %
<u><i>PROF</i></u>	5'-CCCAATTTCCCTCAGTTGAA-3' 5'-TTGGTCCCACCACAGTGTA-3'	104 bp	81°C	83.5 %
<i>PP2AA3</i>	5'-TGCTTACCCTAGTGCCTCTGA-3' 5'-TTCCCAAATTTGTAGCAGCA-3'	113 bp	80°C	96.2 %
<u><i>GAPDH</i></u>	5'-GGTGAGAAACCGTCACTGT-3' 5'-CTTTGCACCACCCTTCAAGT-3'	104 bp	85.5°C	82.5 %
<u><i>αTUB</i></u>	5'-GCACCTTACCGCAACTCTTC-3' 5'-TACTCGGTCAAGGCAAAGG-3'	126 bp	82.5°C	86.8 %
<i>βTUB</i>	5'-TTTCCGGTCAACTCAACTC-3' 5'-ACTGTGAGGGCTCGGTATTG-3'	134 bp	85.5°C	95.5 %
<i>Clath</i>	5'-TGCTTCGCCATCTACTTTT-3' 5'-TCCCAAGTTCCTTTGTTTC-3'	128 bp	80.5°C	91 %
<i>CYP5</i>	5'-CAGTGCCAAAAACAGCAGAA-3' 5'-GGTGAAGTCACTCCCTGAA-3'	143 bp	82°C	92.4 %
<u><i>EF1α</i></u>	5'-AAGCCAGGTATGGTCGTAC-3' 5'-GACATTGTCTCCGGAAGAG-3'	108 bp	85.5°C	96.2 %
<i>PP2AA2</i>	5'-CATGGGCTCAGAAATCACCT-3' 5'-ATTGGTCAACGATGGGGATA-3'	128 bp	82.5°C	93.9 %
<i>SAND</i>	5'-TGCTTACACCACAAGGCAAG-3' 5'-GAAGCAGCATGTCATCAGGA-3'	149 bp	82°C	104.9 %
<i>TIP41</i>	5'-GTTGGGTGCGCATCTCTAAT-3' 5'-AGCTCCGGCAGCTTTTACTT-3'	100 bp	83.5°C	93.2 %
<u><i>TUB β9</i></u>	5'-GCGATTCATTGCAAGGTTTT-3' 5'-CATCATTTCGATCGGGGATT-3'	113 bp	84°C	98.4 %
<i>UBC</i>	5'-GGTGGAGTTTTTCAGTTGC-3' 5'-TCAAGGCAAATCTCTCCTGTC-3'	125 bp	79.5°C	99.1 %
<i>ACT2</i>	5'-AGGATCTTCAGCCCCTTGT-3' 5'-ACCATTGTCTGGCAGCCTAC-3'	119 bp	84°C	102 %
<i>bHLH</i>	5'-GCAAAGTGGCTAAAGCTTCC-3' 5'-CATGGGCTTCTTCCAAGTGT-3'	146 bp	79.5°C	107 %
<i>UBQ10</i>	5'-GCGTTTGTTCATTGCTTCAA-3' 5'-ATGGTGTCCGAGATTCCAC-3'	177 bp	81°C	99.3 %
<u><i>UBC9</i></u>	5'-CGTCTGTAGCGGAAGATA-3' 5'-AGTCTGAATGCAACCTTGG-3'	145 bp	82.5°C	90 %
<i>AOC</i>	5'-CGACAGGAGGTAGGAGCTG-3' 5'-CGCATCCAGTAGCTTCATCA-3'	115 bp	86°C	101 %
<i>MYC2</i>	5'-GGCTAATGGCGGTAATGAAA-3' 5'-GTCAAAGGCTAATCGGAGCTG-3'	142 bp	83.5°C	90 %
<i>PAL</i>	5'-CATGGACAACACTCGTTTGG-3' 5'-TTACGAGCTCGGAGAATTGG-3'	71 bp	82°C	96.6 %
<i>C4H</i>	5'-CAAGCTCCACCTGGACCTA-3' 5'-GCCCATACGGAGAAGCAATA-3'	130 bp	85°C	90.5 %
<i>4CL</i>	5'-ATCAATGAGCCGATGTCTC-3' 5'-CTTAACGATCCGGAAGCAAC-3'	75 bp	84°C	90 %

192 3.2 Expression profile of the candidate reference genes

193 To evaluate the expression stability of each candidate reference gene, Ct values were
194 measured for each individual sample. The expression profiles of the genes across the cell
195 cultures under different conditions of elicitation and across the different tissues of seedlings
196 (see Material and Methods for details) are shown in Figure 1. In cell cultures, all the tested
197 genes are stably expressed except *ACT7*, which is also the gene with the highest mean Ct
198 value. Regarding expression of the twelve potential reference genes in the seedlings, Ct
199 values showed more significant variations than for cell cultures. This could be explained by a
200 wider genetic variability for the seedlings than for the cell cultures. For seedlings, three genes
201 seem to be really unstably expressed in the different organs: *ACT2*, *ACT7* and *β TUB* so they
202 probably wouldn't be acceptable as reference genes.

203 3.3 Reference gene stability analysis

204 In order to rank the reference genes under our experimental conditions, three of the most
205 popular algorithms were used: geNorm, NormFinder and BestKeeper. geNorm is used to rank
206 the genes in accordance to their expression stability value (*M*), which is the average of the
207 pairwise variation of a particular gene with all other candidate reference genes. The lowest the
208 *M* value is, the most stable the gene is. NormFinder provides a stability value as output for
209 each gene, once again, the lower this value is, the higher the stability of the gene is.
210 BestKeeper is used to rank the candidate reference genes according to their coefficient of
211 correlation (*r*) to the BestKeeper Index, which has to be as close as possible to 1. For geNorm
212 and Normfinder analysis, the twelve genes previously selected were ranked. BestKeeper
213 algorithm authorized the simultaneous analysis of only ten genes so the two least stable genes
214 as reported by geNorm and NormFinder were removed from the analysis.

215 3.3.1 Reference gene stability in root cell cultures

216 In Figure 2 are presented the rankings of the reference genes for root cell cultures of chicory
217 obtained with the different algorithms. In agreement with the expression profiles presented in
218 Figure 1, *ACT7* is the gene identified as the least stable by both geNorm and NormFinder.
219 *β TUB* is the second least stable gene so these two genes were excluded from the BestKeeper
220 analysis. For the other genes, NormFinder and GeNorm rankings are quite similar.
221 Nevertheless, *PP2AA3*, which is the best gene according to geNorm is ranked 9th by
222 NormFinder. Greater variations are observed with the BestKeeper ranking as often reported in
223 previous published works (Wan et al., 2010; Xu et al., 2011). The performance of each gene
224 as a reference gene was evaluated using their stability ranking in all three tests (Table 3). The
225 most stable gene identified is *TIP41* followed by *PP2AA2* and *UBC*.

226 **Table 3: Overall ranking of the candidate reference genes for cell cultures and for**
 227 **seedlings after geNorm, NormFinder and BestKeeper analysis. The two lowest ranked**
 228 **genes according to geNorm and Normfinder were excluded from the BestKeeper analysis.**

Gene	Cell cultures					Seedlings				
	geNorm rank	Normfinder rank	BestKeeper rank	Total score	Overall rank	geNorm rank	Normfinder rank	BestKeeper rank	Total score	Overall rank
<i>TIP41</i>	3	2	3	8	1	4	6	6	16	4
<i>PP2AA2</i>	2	1	9	12	2	3	3	5	11	3
<i>UBC</i>	4	3	5	12	2	5	4	8	17	5
<i>SAND</i>	5	4	4	13	3	2	2	3	7	2
<i>PP2AA3</i>	1	9	6	16	4	7	7	7	21	6
<i>CYP5</i>	8	7	2	17	5	6	5	10	21	6
<i>UBQ10</i>	9	10	1	20	6	9	8	4	21	6
<i>ACT2</i>	6	5	10	21	7	11	11	/	33	/
<i>Clath</i>	7	8	8	23	8	1	1	1	3	1
<i>PROF</i>	10	6	7	23	8	8	9	9	26	8
<i>βTUB</i>	11	11	/	33	/	10	10	2	22	7
<i>ACT7</i>	12	12	/	36	/	12	12	/	35	/

229 3.3.2 Reference gene stability in seedling tissues

230 As for root cell cultures, stability of the twelve candidate reference genes was evaluated for
 231 seedling tissues and results are reported in Figure 3. The two least stable genes according to
 232 geNorm and NormFinder are the same as those identified on the basis of expression profiles
 233 *i.e.* *ACT7* and *ACT2* (Fig. 1). *β TUB* also exhibits wide variations of Ct and is indeed ranked
 234 as the third least stable gene by geNorm and NormFinder. However, BestKeeper surprisingly
 235 ranks *β TUB* as the second most stable gene. In all cases, *Clath* is the gene identified as the
 236 most suitable reference gene for normalization of qRT-PCR data from seedlings mRNA.
 237 *SAND* and *PP2AA2* are the next best according to their overall ranking (Table 3). It may also
 238 be noticed that this ranking of the twelve candidate reference genes is quite different from the
 239 one obtained for cell cultures.

240 Nevertheless, we tried to identify reference genes suitable for both cell cultures and seedling
 241 expression profile analyses. The obtained results indicate *TIP41* as the most stably expressed
 242 gene over all the samples but the associated stability values were not good enough to be
 243 considered as acceptable for data normalization. Indeed, the geNorm stability analyze
 244 presented in Figure 4 shows that only three of the candidate reference genes had a stability
 245 value slightly below 1.5 which is the threshold given by this algorithm (Vandesompele et al.,
 246 2002). Therefore, it might be better to conduct analyses of stability separately in order to keep
 247 the most suitable reference genes for each study design.

248 3.3.3 Determination of the optimal number of reference genes for normalization

249 In addition to the candidate reference gene ranking, the geNorm software can also be used to
 250 determine the optimal number of reference genes required for accurate normalization. This

251 relies on calculation of the pairwise variation V_n/V_{n+1} . As recommended by Vandesompele
 252 et al., a V_n/V_{n+1} value below the cutoff value of 0.15 means the addition of the $n+1$
 253 reference gene is not required. Therefore, the first n reference genes are sufficient to
 254 normalize qRT-PCR results (Vandesompele et al., 2002). Consequently, pairwise variation
 255 values of the ranked reference genes were calculated for both cell cultures and seedlings
 256 tissues and the results are presented Figure 5. In either case, the $V_2/3$ value didn't exceed the
 257 proposed cutoff value indicating that the use of the two most stable genes previously
 258 identified is sufficient for reliable normalization. It's therefore recommended to use the
 259 combination of *TIP41* and *PP2AA2* (further referred as "*TIP41+PP2AA2*") for normalization
 260 of cell cultures data while the combination of *Clath* and *SAND* are sufficient for analyzing
 261 data from seedlings tissues.

262 3.4 Expression of GOI in response to MeJA induction

263 In order to validate the reliability of the reference genes previously selected for cell cultures,
 264 the relative quantification of five genes known to be induced by MeJA treatment was done. It
 265 consists of the genes encoding C4H (Cinnamate 4-hydroxylase), PAL (Phe ammonia-lyase),
 266 4CL (4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase), AOC (Allene oxide cyclase) and MYC2
 267 (Transcription factor MYC2). *AOC* and *MYC2* are two genes directly involved in the
 268 Jasmonic acid (JA) pathway. Indeed, *AOC* encodes an enzyme leading to the biosynthesis of
 269 JA whereas *MYC2* encodes a transcription factor that can activate transcription of early JA-
 270 responsive genes such as the one encoding MYC2 itself (Wasternack, 2007). These two genes
 271 have been shown to be induced by MeJA treatment in *Taxus chinensis* cell cultures (Li et al.,
 272 2012). C4H, PAL and 4CL are three enzymes of the early phenylpropanoid pathway and their
 273 genes have been previously shown to be induced by MeJA treatment in *Nicotiana tabacum*
 274 cell cultures (Gális et al., 2006). Arabidopsis orthologs of these genes were identified by
 275 BLASTX and primers for qRT-PCR were designed accordingly (Table 1). Primers
 276 sequences, PCR efficiency and amplicon characteristics are summarized in Table 2.

277 The quantification was realized using normalization by the combination of the two most
 278 stable genes as previously determined and one of the least stables genes in cell cultures i.e.
 279 "*TIP41+PP2AA2*" and *βTUB*, respectively. The best reference gene identified for seedlings
 280 i.e. *Clath*, was also used to normalize the data as well as the best reference gene for cell
 281 cultures alone i.e. *TIP41* to observe the consequence of the addition of another reference gene
 282 on the final results. The results presented in Figure 6 show that the expression levels of *C4H*,
 283 *PAL*, *AOC* and *MYC2* are significantly increased by the MeJA treatment (MJ) compare to the
 284 three negative controls i.e. cell cultures treated with ethanol alone (EtOH), cell cultures
 285 without treatment (MS) or cell cultures before elicitation (T0). In the case of *4CL*, statistical
 286 tests performed did not allow to underlined significant difference within the different
 287 conditions. That said, it is nevertheless interesting to note that level of *4CL* mRNA seems to
 288 be halved after 24 h of culture except when the medium is supplemented with MeJA.
 289 Anyway, relative quantifications obtained with normalization of the data by "*TIP41+*
 290 *PP2AA2*" or by *TIP41* alone lead to similar trends. However, normalization by *βTUB* does
 291 not allow to highlight the increase in the expression levels of *MYC2*, *C4H* and *AOC* under
 292 MeJA treatment compare to EtOH treatment. This normalization by *βTUB* even leads to

293 conclusions opposite to those got with “*TIP41+PP2AA2*” as reference genes. On the other
294 hand, normalization by *Clath* leads to similar expression pattern. Nevertheless, the results are
295 more variable as shown by wider error bars and so, statistical differences are more difficult to
296 underscore.

297 4 Discussion

298 Our major research interests concern the study of the biochemical pathways involved in
299 caffeic ester synthesis in chicory. In order to identify determinants of the phenylpropanoid
300 pathways (effector and signaling components), genomic tools are useful and one of them is
301 gene expression analysis by qRT-PCR. This technique is considered as the most appropriated
302 method for gene expression profiling. It is due to its high sensitivity, specificity, accuracy and
303 reproducibility. Nevertheless several criteria have to be strictly respected. In this purpose,
304 validation of suitable reference genes for data normalization is mandatory to obtain reliable
305 results. To our knowledge, only one previous work has reported the validation of reference
306 genes in chicory (Maroufi et al., 2010). Nevertheless, this study of Maroufi et al. focused on
307 old plants but we know that no universal reference gene can be found that would be suitable
308 for all the different experimental designs. Thus, validation of specific reference genes is
309 required for each design especially with models as different as old plant and cell cultures.

310 In this study, expression levels as well as stability of candidate reference genes were
311 measured in chicory root cell cultures submitted to different conditions and also in different
312 parts of chicory seedlings. Cell cultures were established and treated with MeJA as a known
313 inducer of phenylpropanoid pathway. We have evaluated eighteen candidate reference genes
314 in accordance with Remans *et al.* recommendation concerning the use of a starting pool of at
315 least ten reference genes for evaluation in new experimental conditions (Remans et al., 2014).
316 Twelve of the initial eighteen genes were conserved for analyses with three different
317 softwares: geNorm, NormFinder and BestKeeper. Different rankings were obtained due to the
318 different statistical algorithms associated. Therefore it is important to use at least three
319 different softwares in order to achieve best results as possible in particular to avoid selection
320 of co-regulated genes (Jacob et al., 2013). GeNorm, based on the pairwise variations with no
321 consideration of a possible co-regulation, is particularly sensitive concerning this aspect
322 (Huang et al., 2014). The twelve reference genes were ranked according to the results from
323 the three algorithms.

324 In our experiment with cell cultures elicited with MeJA, *TIP41* is the most suitable gene
325 among all the genes we have tested whereas for the study with different tissues of seedlings
326 *Clath* was identified as the best reference gene. Rankings were significantly different between
327 these two models. When analyzed together, one gene, *TIP41*, would be acceptable to
328 normalize the data. Nevertheless, it is just slightly beyond the recommended geNorm
329 threshold M value. Moreover classical reference genes such as the actin family genes *i.e.*
330 *ACT2* and *ACT7* didn't perform well in the two considered cases whereas a gene encoding
331 actin was ranked as the best in the previous study of Maroufi *et al.* concerning the validation
332 of reference genes for chicory mature plants organs (Maroufi et al., 2010). This emphasizes
333 the importance of validating the reference genes for each experimental design

334 As a proof of principle, the reliability of this validation was evaluated by normalizing the
335 expression of five genes reported to be induced by MeJA with the combination of the two top
336 ranked genes *i.e.* “*TIP41+PP2AA2*”, the best stable gene *i.e.* *TIP41* or one of the least stable
337 gene *i.e.* *βTUB*. The results clearly show that normalization with inappropriately validated
338 gene could lead to totally erroneous conclusions. Similarly, normalization with a reference
339 gene identified as the best for the seedlings study design *i.e.* *Clath* can't be used for the cell
340 cultures study design to obtain reliable results. This constitutes another demonstration of the
341 importance of a proper validation of reference genes each time the studied conditions vary. As
342 a result, we could show that in chicory cells *MYC2*, *AOC*, *PAL* and *C4H* expressions were
343 induced by MeJA. *PAL*, *C4H* and *4Cl* are core phenylpropanoid genes and were previously
344 shown as co-induced through the action of a R2R3 MYB transcription factor, notably in
345 tobacco cell culture (Gális et al., 2006). In our experimental conditions, no evidence of *4Cl*
346 induction by MeJA has been given even if trends in this sense are observable. Selected *4Cl*
347 gene may not encode the isoform of this enzyme induced in these conditions. However, these
348 results validate our experimental design and we can now use this system to try to identify new
349 genes potentially involved in this metabolism.

350 To conclude, this study reports on the selection and validation of reference genes suitable for
351 normalization of expression levels of GOI in chicory. We provide a list of reference genes as
352 well as specific primers that may be used in the future by researchers working on *C. intybus*.
353 The expression stability of twelve genes was evaluated across two different models *i.e.* cell
354 cultures elicited with MeJA and dissected seedlings using the three softwares geNorm,
355 NormFinder and BestKeeper. The most suitable reference genes were determined by
356 comparing the results given by the three programs. Our data support the actual
357 recommendations concerning a proper validation of reference genes for qRT-PCR each time
358 the experimentation design changes even if based on the same plant.

359 Acknowledgments

360 The authors thank Sylvain Legrand for his helpful advice on bioinformatics and gratefully
361 acknowledge Najia Voedts for cell culture maintenance.

362 **References**

- 363 Andersen, C. L., Jensen, J. L., and Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time
 364 quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation
 365 approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer
 366 data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- 367 Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan,
 368 T., Pfaffl, M., Shipley, G., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for
 369 publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–22.
 370 doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- 371 Carazzone, C., Mascherpa, D., Gazzani, G., and Papetti, A. (2013). Identification of phenolic
 372 constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid
 373 chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass
 374 spectrometry. *Food Chem.* 138, 1062–71. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.060.
- 375 Collin, H. A. (2001). Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth*
 376 *Regul.* 34, 119–134. doi:10.1023/A:1013374417961.
- 377 Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., and Scheible, W.-R. (2005).
 378 Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript
 379 normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139, 5–17. doi:10.1104/pp.105.063743.
- 380 Gális, I., Simek, P., Narisawa, T., Sasaki, M., Horiguchi, T., Fukuda, H., and Matsuoka, K.
 381 (2006). A novel R2R3 MYB transcription factor NtMYBJS1 is a methyl jasmonate-
 382 dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *Plant J.* 46,
 383 573–92. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02719.x.
- 384 De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S., and Goossens, A. (2012). Transcriptional
 385 machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* 17,
 386 349–59. doi:10.1016/j.tplants.2012.03.001.
- 387 Gimeno, J., Eattock, N., Van Deynze, A., and Blumwald, E. (2014). Selection and validation
 388 of reference genes for gene expression analysis in switchgrass (*Panicum virgatum*) using
 389 quantitative real-time RT-PCR. *PLoS One* 9, e91474. doi:10.1371/journal.pone.0091474.
- 390 Heimler, D., Isolani, L., Vignolini, P., and Romani, A. (2009). Polyphenol content and
 391 antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming.
 392 *Food Chem.* 114, 765–770. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.010.
- 393 Huang, L., Yan, H., Jiang, X., Zhang, Y., Zhang, X., Ji, Y., Zeng, B., Xu, B., Yin, G., Lee, S.,
 394 et al. (2014). Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase
 395 PCR in orchardgrass subjected to various abiotic stresses. *Gene.*
 396 doi:10.1016/j.gene.2014.10.017.
- 397 Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., and Saeed, M. (2012).
 398 Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm.*
 399 *Bioallied Sci.* 4, 10–20. doi:10.4103/0975-7406.92725.
- 400 Jacob, F., Guertler, R., Naim, S., Nixdorf, S., Fedier, A., Hacker, N. F., and Heinzlmann-
 401 Schwarz, V. (2013). Careful selection of reference genes is required for reliable
 402 performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. *PLoS One* 8, e59180.
 403 doi:10.1371/journal.pone.0059180.

- 404 Li, S., Zhang, P., Zhang, M., Fu, C., Zhao, C., Dong, Y., Guo, A., and Yu, L. (2012).
 405 Transcriptional profile of *Taxus chinensis* cells in response to methyl jasmonate. *BMC*
 406 *Genomics* 13, 295. doi:10.1186/1471-2164-13-295.
- 407 Løvdaal, T., and Lillo, C. (2009). Reference gene selection for quantitative real-time PCR
 408 normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Anal. Biochem.* 387,
 409 238–42. doi:10.1016/j.ab.2009.01.024.
- 410 Maroufi, A., Van Bockstaele, E., and De Loose, M. (2010). Validation of reference genes for
 411 gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time
 412 PCR. *BMC Mol. Biol.* 11.
- 413 Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with
 414 tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi: 10.1111/j.1399-
 415 3054.1962.tb08052.x.
- 416 Nicot, N., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., and Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection
 417 for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp.*
 418 *Bot.* 56, 2907–14. doi:10.1093/jxb/eri285.
- 419 Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT –
 420 PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007.
- 421 Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T. (2004). Determination of stable
 422 housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity:
 423 BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509–
 424 515.
- 425 Pushparaj, P. N., Low, H. K., Manikandan, J., Tan, B. K. H., and Tan, C. H. (2007). Anti-
 426 diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J.*
 427 *Ethnopharmacol.* 111, 430–434.
- 428 R Core Team (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Found.*
 429 *Stat. Comput.* doi:10.1007/978-3-540-74686-7.
- 430 Remans, T., Keunen, E., Bex, G. J., Smeets, K., Vangronsveld, J., and Cuypers, A. (2014).
 431 Reliable Gene Expression Analysis by Reverse Transcription-Quantitative PCR:
 432 Reporting and Minimizing the Uncertainty in Data Accuracy. *Plant Cell.*
 433 doi:10.1105/tpc.114.130641.
- 434 Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2005). Dietary
 435 polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 287–306.
 436 doi:10.1080/1040869059096.
- 437 Street, R. A., Sidana, J., and Prinsloo, G. (2013). *Cichorium intybus*: Traditional uses,
 438 phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-based Complement. Altern.*
 439 *Med.* 2013. doi:10.1155/2013/579319.
- 440 Tusch, D., Lajoix, A.-D., Hosy, E., Azay-Milhou, J., Ferrare, K., Jahannault, C., Cros, G.,
 441 and Petit, P. (2008). Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and
 442 glucose uptake. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 131–5.
 443 doi:10.1016/j.bbrc.2008.09.088.
- 444 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and
 445 Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by
 446 geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, research0034.1–
 447 research0034.11. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.

- 448 Wan, H., Zhao, Z., Qian, C., Sui, Y., Malik, A. A., and Chen, J. (2010). Selection of
449 appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time
450 polymerase chain reaction in cucumber. *Anal. Biochem.* 399, 257–61.
451 doi:10.1016/j.ab.2009.12.008.
- 452 Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action
453 in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 100, 681–97.
454 doi:10.1093/aob/mcm079.
- 455 Wasternack, C., and Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal
456 transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to
457 the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* 111, 1021–58. doi:10.1093/aob/mct067.
- 458 Xu, M., Zhang, B., Su, X., Zhang, S., and Huang, M. (2011). Reference gene selection for
459 quantitative real-time polymerase chain reaction in *Populus*. *Anal. Biochem.* 408, 337–9.
460 doi:10.1016/j.ab.2010.08.044.
- 461 Zhu, X., Li, X., Chen, W., Chen, J., Lu, W., Chen, L., and Fu, D. (2012). Evaluation of new
462 reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different
463 experimental conditions. *PLoS One* 7, e44405. doi:10.1371/journal.pone.0044405.
- 464

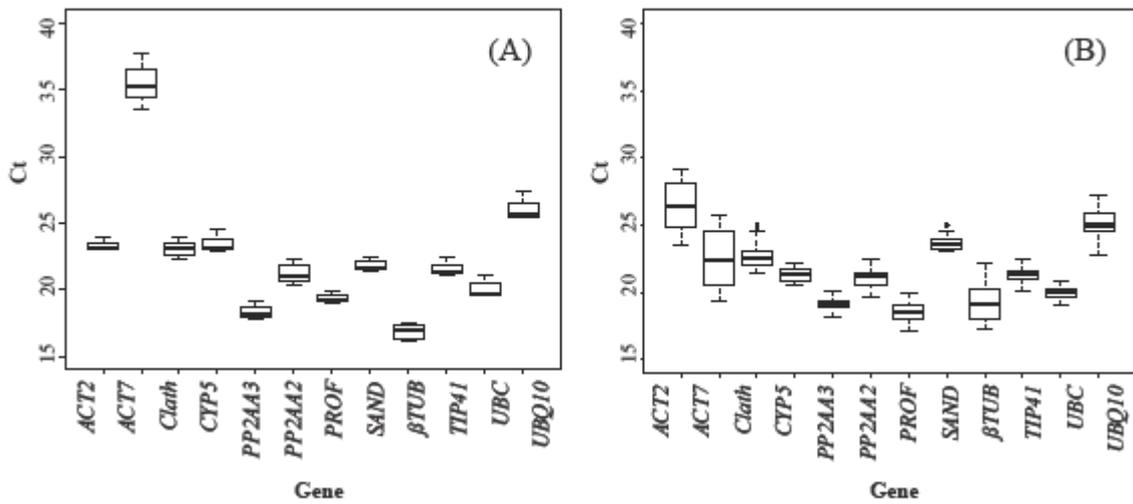


Figure 1: Cycle threshold (Ct) values of the candidate reference genes across the different experimental samples ((A): cell cultures; (B): seedlings). Box-plot graph of Ct values show the median values as line across the box. Lower and upper boxes indicating the first and the third quartile. Whiskers represent the maximum and minimum values.

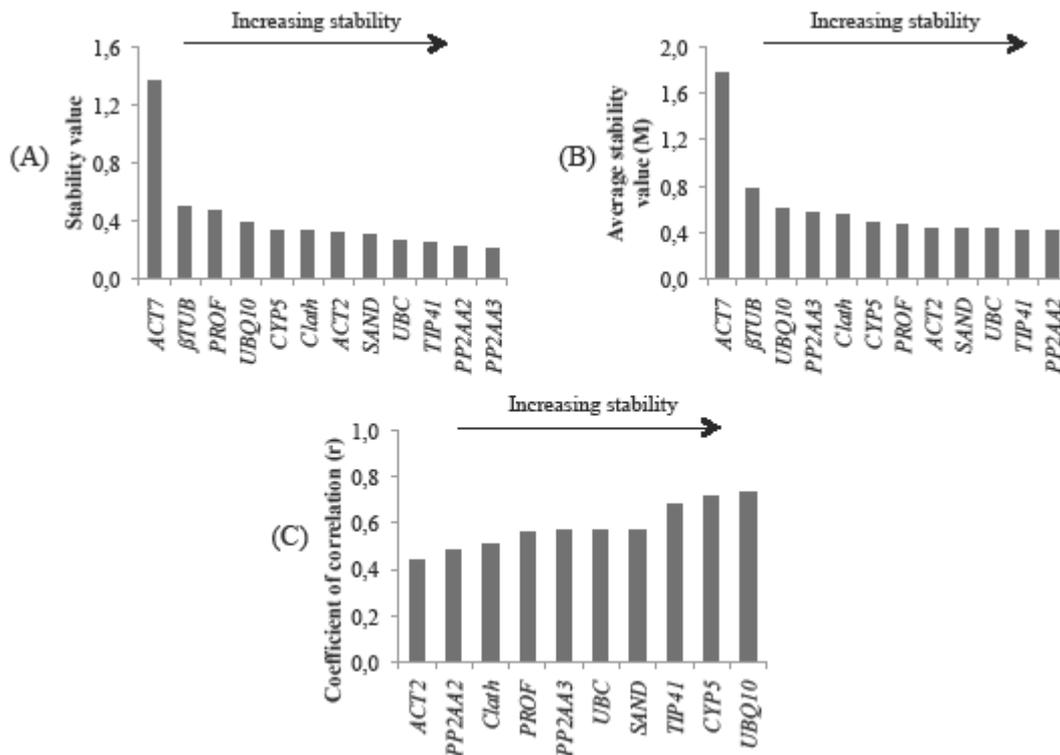


Figure 2: Ranking of the candidate reference genes for chicory cell cultures under various conditions of elicitation according to NormFinder (A) geNorm (B) and BestKeeper (C).

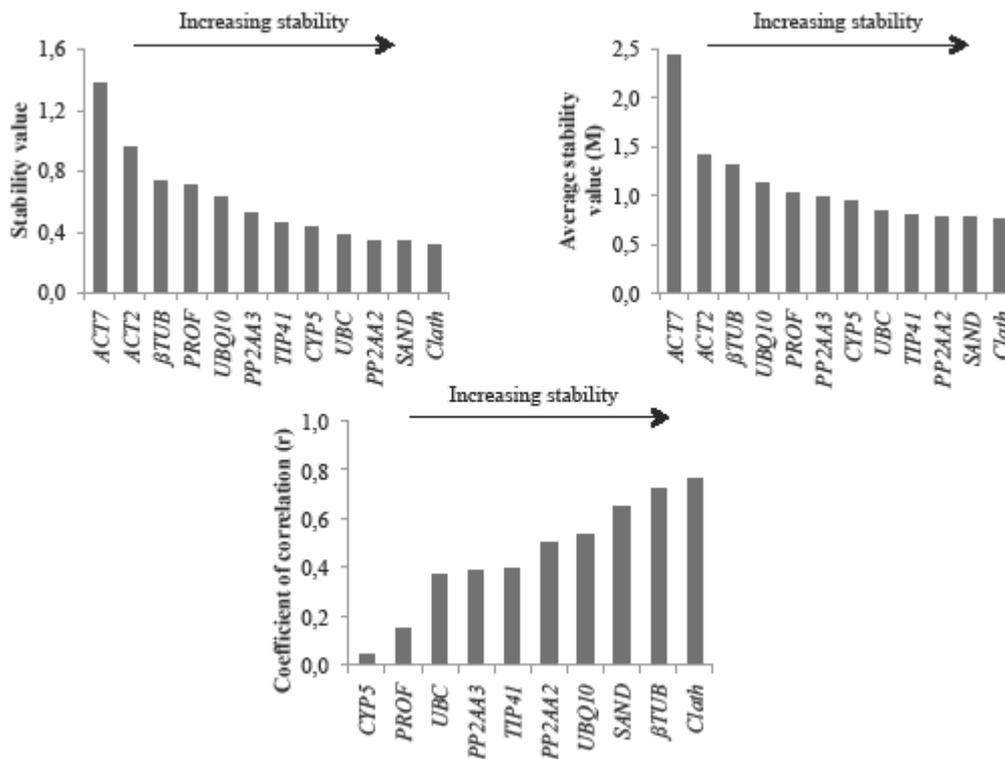


Figure 3: Ranking of the candidate reference genes for different tissues of chicory seedlings according to NormFinder (A) geNorm (B) and BestKeeper (C).

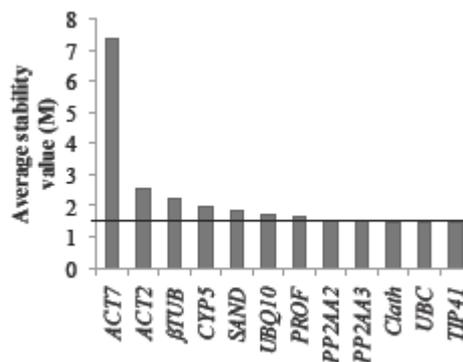


Figure 4: Ranking of the candidate reference genes for both chicory seedlings and cell cultures according to geNorm. The black line represents the threshold M value of 1.5 above which a putative reference gene is not considered as acceptable.

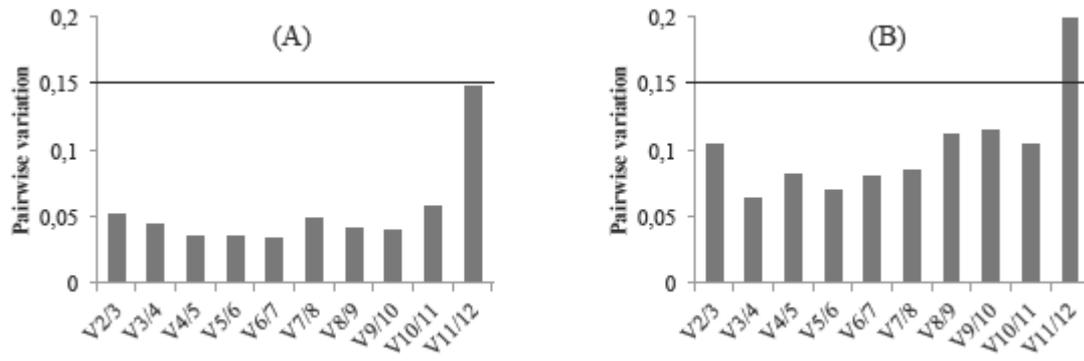


Figure 5: Pairwise variation (V_n/V_{n+1}) analysis of the candidate reference genes for cell cultures (A) and for seedlings tissues (B). The black line represents the recommended threshold value of 0.15 below which the inclusion of an additional reference gene is not necessary.

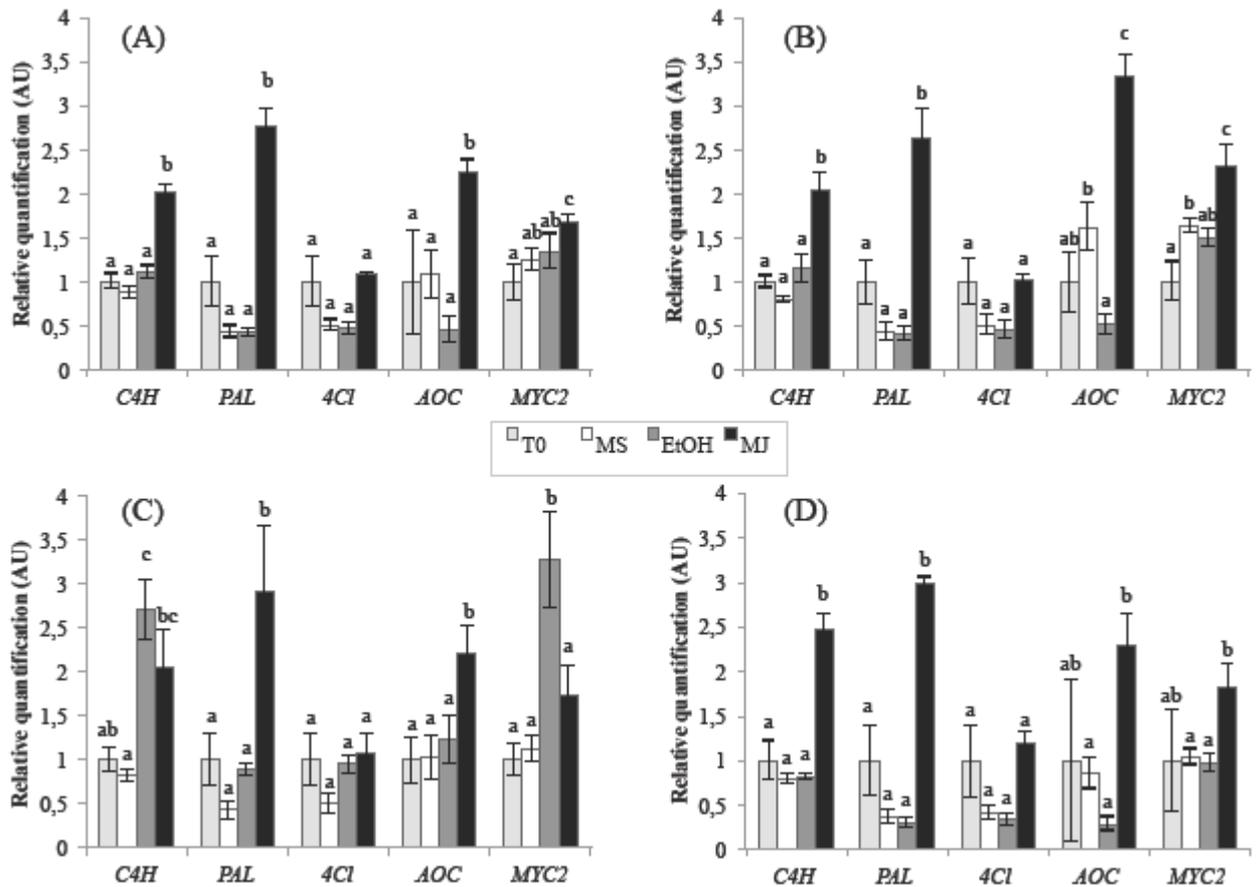


Figure 6: Relative quantification of targeted genes expression in chicory cell cultures using different reference genes (TIP41 and PP2AA2 (A), TIP41 alone (B), β TUB (C) or Clath (D)) under various elicitation conditions. EtOH: cell cultures treated with ethanol for 24 h, MJ: cell cultures treated with 50 μ M MeJA for 24 h, MS: cultures kept on MS medium for 24 h, T0: cells sampled before elicitation. Error bars indicate standard errors of the mean. Different letters above histograms indicate statistical difference highlighted using ANOVA (p-value < 0.05).

Guillaume LEGRAND, 2015. Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire.

Thèse de doctorat de l'Université de Lille 1. Equipe Adaptation aux Stress et Qualités des Végétaux – Institut Charles Viollette, Villeneuve d'Ascq.

La chicorée produit et accumule une panoplie originale d'esters d'acide caféique : les acides caftarique (CTA), chicorique (diCTA), chlorogénique (CQA) et isochlorogénique (diCQA). En plus de leurs multiples rôles physiologiques et écologiques pour la plante, ces composés phénoliques sont dotés de nombreuses propriétés nutritionnelles et thérapeutiques. La valorisation de ces composés nécessite, au préalable, une connaissance approfondie de leur métabolisme. Si la biosynthèse du CQA est bien documentée, celles des autres molécules ne sont que partiellement décrites. L'objectif de ce travail de thèse consistait en la caractérisation de la voie de biosynthèse du CQA et du diCQA. L'analyse détaillée des contenus en polyphénols a révélé une distribution tissulaire originale. Le CTA et le diCTA sont les composés majeurs dans les feuilles alors que le diCQA est le composé majeur dans les racines. Les contenus en CQA ne permettent pas de différencier ces organes. En vue d'une analyse transcriptomique, plusieurs systèmes expérimentaux ont été testés de manière à induire la production et l'accumulation des composés ciblés. Par une approche de génétique inverse, deux gènes codant des HCTs et trois autres gènes des HQTs ont été identifiés et caractérisés. Ces protéines interviennent dans la synthèse du CQA. Une approche de biochimie a permis d'identifier une séquence protéique potentiellement impliquée dans la synthèse de diCQA chez la patate douce. Par homologie de séquence, un gène candidat a été identifié chez la chicorée. Les travaux présentés dans ce mémoire constituent une contribution significative au décryptage des voies de biosynthèse de ces molécules au fort potentiel.

Mots clés : acides hydroxycinnamiques, esters d'acide caféique, BAHD, GDSL, gène candidat

Guillaume LEGRAND, 2015. Characterization of chlorogenic acids metabolism in chicory: biochemical and molecular approaches

PhD thesis, University of Lille 1. Team Adaptation aux Stress et Qualités des Végétaux – Institut Charles Viollette, Villeneuve d'Ascq (France).

Chicory synthesizes and accumulates an original combination of caffeic acid i.e. caftaric (CTA), chicoric (diCTA), chlorogenic and isochlorogenic (diCQA) acids. In addition to their multiple physiological and ecological roles in plants, these compounds have many pharmaceutical and nutritional properties. A complete understanding of their biochemical pathways is required for optimization of their production. If CQA biosynthesis is well documented, the pathways involved in the synthesis of the other molecules are far to be fully understood. The goal of this PhD thesis was to characterize the pathways involved in CQA and diCQA synthesis.

Detailed analysis of phenolic contents revealed an original tissue distribution. CTA and diCTA are mainly accumulated in shoots whereas diCQA was the main compound in roots. CQA is uniformly distributed. To anticipate a transcriptomic analysis, several experimental models have been used in order to modulate the synthesis and the accumulation of the compounds of interest. Through a reverse genetic approach, we identified and characterized 2 genes encoding HCTs and 3 genes encoding HQTs. These proteins are involved in the synthesis of CQA. By a biochemical approach, we identify a peptide sequence putatively involved in diCQA synthesis in sweet potato. An homologous gene has been identified in chicory.

Data reported here contribute to a better understanding of the biosynthesis of these high-value compounds.

Key words: hydroxycinnamic acids, caffeic acid esters, BAHD, GDSL, candidate gene