

Université de Lille

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

THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Spécialité

Biotechnologies agroalimentaires, Sciences de l'aliment,
Physiologie

**Edition par CRISPR/Cas9 de la voie de
biosynthèse des lactones sesquiterpéniques
en vue de modifier l'amertume de la chicorée
industrielle (*Cichorium intybus* L.)**

Par Justine DOMONT

Soutenue le 21 mars 2023 devant la commission d'examen :

Philippe HUGUENEY, *Directeur de recherche, INRAE de Strasbourg*
Vincent COURDAVAULT, *Maître de conférences, Université de Tours*
Nathalie JULLIAN-PAWLICKI, *Professeur, Université d'Amiens*
Marwa ROUMANI, *ATER, Université de Lorraine*
Jean-Louis HILBERT, *Professeur, Université de Lille*
Caroline RAMBAUD, *Maître de conférences, Université de Lille*

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Président du jury
Directrice de thèse

Université de Lille

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

THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Spécialité

Biotechnologies agroalimentaires, Sciences de l'aliment,
Physiologie

**Edition par CRISPR/Cas9 de la voie de
biosynthèse des lactones sesquiterpéniques
en vue de modifier l'amertume de la chicorée
industrielle (*Cichorium intybus* L.)**

Par Justine DOMONT

Soutenue le 21 mars 2023 devant la commission d'examen :

Philippe HUGUENEY, *Directeur de recherche, INRAE de Strasbourg*
Vincent COURDAVAULT, *Maître de conférences, Université de Tours*
Nathalie JULLIAN-PAWLICKI, *Professeur, Université d'Amiens*
Marwa ROUMANI, *ATER, Université de Lorraine*
Jean-Louis HILBERT, *Professeur, Université de Lille*
Caroline RAMBAUD, *Maître de conférences, Université de Lille*

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Président du jury
Directrice de thèse

RÉSUMÉ

Edition par CRISPR/Cas9 de la voie de biosynthèse des lactones sesquiterpéniques en vue de modifier l'amertume de la chicorée (*Cichorium intybus* L.)

La chicorée industrielle (*Cichorium intybus* var. *sativum*) est une plante emblématique de la Région Hauts-de-France. Cette plante est connue pour ses vertus thérapeutiques, ses propriétés nutritionnelles, mais aussi pour son goût amer. Les racines de chicorée industrielle sont habituellement utilisées pour la production de substitut de café et la production d'inuline. Le développement de nouveaux ingrédients fonctionnels à base de chicorée, nécessite de créer des variétés moins amères, car l'amertume constitue un frein à la consommation. Cette amertume est principalement due à la présence de lactones sesquiterpéniques, des métabolites spécialisés dont la voie de biosynthèse est partiellement élucidée. Dans ce cadre, une caractérisation des gènes impliqués dans la synthèse des lactones sesquiterpéniques a été entreprise sur le génome de la chicorée industrielle ChicBitter002. La chicorée ChicBitter002 présente de nombreux avantages pour la recherche expérimentale puisque c'est un clone dont la propagation *in vitro* est maîtrisée au sein du laboratoire, capable de s'autoféconder, pour laquelle une méthode d'édition par CRISPR/Cas9 a été mise au point, et dont la séquence du génome est disponible auprès de l'entreprise partenaire, Florimond-Desprez. Ainsi, 10 gènes ont été identifiés parmi lesquels, les gènes *germacrène A synthase (GAS)*, sous forme longue ou courte, le gène *germacrène A oxydase (GAO)*, et les gènes *costunolide synthase (COS)*. Dans le but d'établir une preuve de concept que l'inhibition des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des lactones sesquiterpéniques provoque une diminution de l'amertume, la chicorée Chicbitter002 a été éditée via une transformation stable par *R. rhizogenes*, permettant une régénération rapide de plantes ainsi qu'une efficacité d'édition élevée (26%). Afin de générer des mutants, les gènes *GAS* et *GAO* ont été ciblés. L'étude des mutants obtenus a permis de valider que la mutation bi-allélique d'au moins deux copies (*GAS-S1* et *GAS-S2*) de la forme courte du gène *GAS* ou du gène *GAO* provoque une réduction significative de la production de lactones sesquiterpéniques. Une corrélation entre ces molécules et la perception de l'amertume, établie par analyse sensorielle, a aussi permis d'obtenir des scores d'amertume pour les mutants *GAS-S1* et *GAS-S2* générés, bien inférieurs à ceux des témoins. L'édition par CRISPR/Cas9 a ensuite pu être réalisée sur un matériel végétal d'intérêt appliqué, utilisé pour la génération de nouvelles variétés de chicorée et créé par les sélectionneurs. La méthode utilisée a été celle de la transfection de protoplastes, mise au point au sein du laboratoire, et que nous avons optimisée. La méthode est plus longue pour obtenir des mutants mais présente l'avantage de générer des plantes exemptes de transgènes. De nombreux mutants ont pu être générés dont la validation par une analyse métabolique reste à réaliser.

Mot clés : chicorée, amertume, CRISPR/Cas9, lactones sesquiterpéniques, protoplastes, chevelus racinaires

ABSTRACT

CRISPR/Cas9 editing of the sesquiterpene lactone biosynthetic pathway to modify the bitterness in industrial chicory (*Cichorium intybus* L.)

The industrial chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*) is an emblematic plant of the Hauts-de-France region. This plant is known for its therapeutic and nutritional properties, but also for its bitter taste. Industrial chicory roots are usually used for the production of coffee substitute and inulin production. The development of new functional ingredients based on chicory requires the creation of less bitter varieties, as bitterness is a barrier to consumption. This bitterness is mainly due to the presence of sesquiterpene lactones, specialized metabolites whose biosynthetic pathway is partially elucidated. In this context, a characterization of the genes involved in the synthesis of sesquiterpene lactones was realized in the industrial chicory ChicBitter002 genome. ChicBitter002 chicory offers many advantages for experimental research since it is a clone whose *in vitro* propagation is mastered in the laboratory, capable of self-fertilization, for which a CRISPR/Cas9 editing method has been developed, and whose genome sequence is available from the partner company, Florimond-Desprez. Thus, 10 genes were identified, including the *germacrene A synthase* (*GAS*) genes, in long or short form, the *germacrene A oxidase* (*GAO*) gene, and the *costunolide synthase* (*COS*) genes. In order to establish a proof of concept that inhibition of genes involved in the sesquiterpene lactone biosynthetic pathway causes a decrease in bitterness, Chicbitter002 chicory was edited *via* a stable transformation by *R. rhizogenes*, allowing a rapid plant regeneration and a higher mutation efficiency (26%). In order to generate mutants, the *GAS* and *GAO* genes were targeted. The study of these mutants allowed to validate that the bi-allelic mutation of at least two copies (*GAS-S1* and *GAS-S2*) of the short form of the *GAS* gene or of the *GAO* gene causes a significant reduction in the production of sesquiterpene lactones. A correlation between these molecules and bitterness perception, established by sensory analysis, also resulted in bitterness score for the *GAS-S1* and *GAS-S2* mutants that were significantly lower than those of controls. CRISPR/Cas9 editing could then be performed on plant material of applied interest, used for the generation of new chicory varieties and created by breeders. The method used was protoplast transfection, developed in the laboratory, which we optimized. This method is more time consuming to obtain mutants but has the advantage of generating transgene-free plants. Numerous mutants have been generated and their validation by metabolic analysis remains to be done.

Keywords : chicory, bitterness, CRISPR/Cas9, sesquiterpenes lactones, protoplasts, hairy roots

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier la région Hauts-de-France et l'entreprise Florimond-Desprez d'avoir participé au financement de ma thèse.

Je remercie aussi les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : Vincent Courdavault et Philippe Hugueney en tant que rapporteurs, et Nathalie Jullian-Pawlicki, Marwa Roumani en tant qu'examineurs.

Merci également aux membres de mon comité de thèse Nicolas Navrot et Nicolas Szydlowski d'avoir pris le temps de me conseiller sur mon projet lors de nos rencontres.

Mes remerciements vont ensuite à Jean-Louis Hilbert pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pendant presque 4 ans, à Bruno Desprez pour ses critiques constructives lors de nos réunions et de m'avoir fait confiance pour mener à bien cette thèse, et à tous les membres de l'équipe Chic41H pour les échanges et les débats lors nos réunions.

J'adresse un immense merci à ma directrice de thèse Caroline Rambaud. Vous m'avez fait confiance pour cette thèse, vous avez toujours été de bons conseils et j'ai beaucoup appris auprès de vous. J'en profite aussi pour m'excuser pour toutes les fautes de grammaire que j'ai pu faire et que vous avez eu la patience de corriger.

Un grand merci aux personnes du LGB : Ellen, Aurélie, Sébastien, Daphné, Valérie, et surtout Thierry Cadalen, qui a pris le temps de m'expliquer les outils pour la visualisation de génome, pour l'obtention de données de génétique et qui a été d'une grande aide pour la caractérisation des gènes qui sont au cœur de ce sujet de thèse. Merci à Philippe Hance pour ses connaissances pointues sur les lactones sesquiterpéniques, ses conseils sur l'analyse par HPLC et le partage de son travail sur les analyses sensorielles. Merci pour votre contribution à mes travaux de thèse et pour tous les échanges que l'on a pu avoir.

Je remercie aussi les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ma thèse : Guillaume Bernard, qui a mis au point l'édition par CRISPR/Cas9 dans la chicorée, Camille Locquet, Florent Ducrocq, Solenne Guérin-Chuine, Louis Motte et Margot Thiblet, qui ont tous apporté leur pierre à l'avancée de cette thèse. Un immense merci à Audrey Etienne, Harmony Alves Dos Santos et à Abigaël Delcourt qui m'ont apporté un soutien énorme pour la gestion des plantes, pour l'avancée des travaux et pour les réflexions autour des problèmes de manips.

Merci à tous les membres du 3^{ème} étage du SN2. Merci à David, pour toutes ses remarques pertinentes, merci à Anca, Julie et Damien, pour les conversations et les échanges que l'on a pu avoir. Merci à vous, Céline, Magalie, Audrey, Harmony, Vanessa et Mélanie, pour tous les moments de partage, de rigolade, de ras-le-bol que l'on a pu partager, tous les goûters, toutes les fois où on a refait le monde. Tous ces moments m'ont aussi permis de rester motivé et m'ont permis de garder le moral. Ces 4 années au laboratoire sont passées rapidement grâce à vous. Merci, c'est grâce à votre soutien si je suis devenue docteur et pas un Willi Waller !

Enfin, d'un aspect plus personnel, je remercie ma famille et particulièrement ma sœur, pour son soutien et sa bonne humeur, bien que plusieurs centaines de km nous séparent maintenant. Une pensée pour Elsa, Romane, Mohamed, Arnaud, Cécile, Claire, Jean-Louis et Alex. Vous êtes ma deuxième famille, mon super soutien ! J'ai pu compter sur vous tout au long de mes études et tout au long de cette thèse, et je ne vous remercierais jamais assez pour tout ce que vous m'apportez au quotidien !

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| ABREVIATIONS..... | 5 |
| LISTE DES FIGURES..... | 7 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | 10 |
| INTRODUCTION GENERALE | 12 |
| 1. La chicorée (<i>Cichorium intybus</i> L.), une plante d'intérêt..... | 13 |
| 1.1. Taxonomie de la chicorée et culture..... | 13 |
| 1.2. Utilisation de la chicorée..... | 15 |
| 1.3. Composition de la racine de chicorée..... | 19 |
| 1.3.1. L'inuline..... | 19 |
| 1.3.2. Les métabolites spécialisés..... | 20 |
| Les composés phénoliques..... | 21 |
| Les composés terpéniques | 23 |
| 1.4. L'amertume de la chicorée..... | 26 |
| 2. L'amertume, une saveur souvent mal aimée..... | 28 |
| 2.1. La perception des saveurs et l'amertume..... | 28 |
| 2.2. L'amertume chez les végétaux..... | 29 |
| 2.3. Présentation des différentes méthodes de désamérisation..... | 34 |
| 3. L'édition du génome chez les plantes..... | 36 |
| 3.1. Edition du génome..... | 36 |
| 3.2. Historique de CRISPR/Cas..... | 37 |
| 3.3. Mécanisme d'action du CRISPR..... | 38 |
| 4. Contexte et objectifs de la thèse..... | 39 |
| CHAPITRE 1 : Caractérisation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs..... | 42 |
| 1. Introduction..... | 43 |
| 2. Matériel et Méthodes..... | 46 |
| 2.1. Matériel végétal..... | 46 |

| | |
|--|----|
| 2.2. Matériel génétique..... | 46 |
| 2.3. Identification des gènes <i>GAS</i> , <i>GAO</i> et <i>COS</i> | 46 |
| 2.4. Définition des séquences cibles dans les gènes <i>GAS</i> , <i>GAO</i> , et <i>COS</i> :..... | 47 |
| 2.5. Préparation des pools d'ADN génomique..... | 47 |
| 2.6. Préparation des bibliothèques d'ADN génomique..... | 47 |
| 2.7. Acquisition et traitement des données de séquençage..... | 48 |
| 2.8. Détermination du contenu en STLs dans les chicorées..... | 48 |
| 3. Résultats..... | 49 |
| 3.1. Caractérisation des gènes de la voie de biosynthèse des STLs..... | 49 |
| 3.1.1. <i>Germacrène A synthase (GAS)</i> | 49 |
| 3.1.2. <i>Germacrène A oxydase (GAO)</i> | 55 |
| 3.1.3. <i>Costunolide synthase (COS)</i> | 56 |
| 3.2. Définition des cibles nécessaires pour l'édition des gènes par CRISPR/Cas9 dans la chicorée ChicBitter002..... | 56 |
| 3.3. Recherche de variabilité dans des composantes de chicorées..... | 57 |
| 3.3.1. Préparation des bibliothèques d'ADN génomique des différentes composantes..... | 57 |
| 3.3.2. Analyse de la variabilité des différentes composantes de chicorée..... | 58 |
| 3.3.3. Variabilité inter-génotype des cibles définies pour l'édition par CRISPR/Cas9..... | 62 |
| 4. Discussion..... | 62 |
| CHAPITRE 2 : Edition par CRISPR/Cas9 des gènes impliqués dans la synthèse des STLs, via une transformation médiée par <i>R. rhizogenes</i> | 66 |
| Avant-propos..... | 67 |
| CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of <i>CiGAS</i> and <i>CiGAO</i> to reduce bitterness in chicory (<i>Cichorium intybus</i> L.)..... | 72 |
| 1. Introduction..... | 74 |
| 2. Materials and Methods..... | 75 |
| 2.1. Plant material..... | 75 |
| 2.2. Identification of <i>CiGAS</i> and <i>CiGAO</i> genes..... | 76 |

| | |
|---|-----|
| 2.3. CRISPR/Cas9 vector construction | 76 |
| 2.4. Generation of chicory transformed plants | 77 |
| 2.5. Genotyping and sequencing of edited HR chicory plants | 77 |
| 2.6. Determination of the STL content in chicory materials | 78 |
| 2.7. LC-QTOF-HRMS analysis of sesquiterpene lactones..... | 78 |
| 2.8. Construction of bitterness reference scale | 79 |
| 2.9. Statistical analysis..... | 80 |
| 3. Results | 80 |
| 3.1. Identification of <i>CiGAS</i> and <i>CiGAO</i> genes..... | 80 |
| 3.2. Targeting of <i>CiGAS</i> and <i>CiGAO</i> genes | 81 |
| 3.3. Identification of the CRISPR/Cas9 mutagenesis events and characterization of the HR mutant lines | 82 |
| 3.4. Presence of different STL forms in the chicory materials | 86 |
| 3.5. Analysis of the total STLs content in edited plants regenerated from HR lines..... | 87 |
| 3.6. Sensory analysis..... | 89 |
| 4. Discussion | 91 |
| 5. Conclusion | 94 |
| 6. Supplementary Material..... | 96 |
| 7. References..... | 106 |
| 8. Éléments complémentaires..... | 111 |
| 8.1. Matériel et Méthodes. | 111 |
| 8.1.1. Matériel végétal. | 111 |
| 8.1.2. Définition des séquences cibles et constructions plasmidiques..... | 111 |
| 8.1.3. Extraction ADN et détection des mutations..... | 112 |
| 8.1.4. Analyse du latex de feuilles de chicorées..... | 112 |
| 8.2. Résultats et discussions..... | 113 |
| 8.2.1. Dosage des STLs dans du latex des feuilles de chicorées mutantes..... | 113 |
| 8.2.2. Analyse des croisements et autofécondations de chicorées mutantes..... | 116 |

| | |
|--|-----|
| 8.2.3. Génération de chevelus racinaires édités par CRISPR/Cas9 chez la composante ChicBitter003..... | 118 |
| CHAPITRE 3 : Edition par CRISPR/Cas9 des gènes impliqués dans la synthèse des STL, via une transformation de protoplastes médiée par PEG. | 122 |
| 1. Introduction..... | 123 |
| 2. Matériel et Méthodes. | 125 |
| 2.1. Matériel végétal. | 125 |
| 2.2. Matériel génétique..... | 126 |
| 2.3. Isolement et culture des protoplastes des 5 composantes de chicorée..... | 126 |
| 2.4. Transfection du plasmide GFP dans les protoplastes de ChicBitter001..... | 127 |
| 2.5. Transfection des protoplastes des composantes de chicorées..... | 127 |
| 2.6. Génotypage des plantes éditées et séquençage des mutants..... | 128 |
| 3. Résultats | 129 |
| 3.1. Efficacité de callogénèse des 5 composantes de chicorées. | 129 |
| 3.2. Optimisation de la transfection de protoplastes..... | 129 |
| 3.3. Edition des gènes <i>GAS</i> et <i>GAO</i> par transfection de protoplastes issus de ChicBitter003. ... | 132 |
| 3.4. Edition des gènes <i>GAS</i> et <i>GAO</i> par transfection de protoplastes issus de ChicBitter004 et ChicBitter006..... | 135 |
| 4. Discussion..... | 136 |
| DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 140 |
| REFERENCES | 146 |

ABREVIATIONS

| | |
|------------|--|
| 1-SST | Sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase |
| 1-FFT | Fructane:fructane 1-fructosyltransférase |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| ADN-T | ADN de transfert |
| CQA | Acide cafféoylquinique |
| COS | Costunolide synthase |
| CRISPR/Cas | Cluster Regularly Interspace Short Palindromic Repeats (CRISPR)–associated (CAS) |
| crRNA | CRISPR RNA |
| DHdLc | 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine |
| DHLc | 11(S),13-dihydrolactucine |
| DHLp | 11(S),13-dihydrolactuopicrine |
| dLc | 8-déoxylactucine |
| DMAPP | Diméthylallyl pyrophosphate |
| FPP | Farnésyl pyrophosphate |
| GAO | Germacrène A oxydase |
| GAS | Germacrène A synthase |
| GAS-L | Germacrène A synthase, forme longue |
| GAS-S | Germacrène A synthase, forme courte |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GPP | Géranyl diphosphate |
| HR | Hairy root |
| IPP | Isopentényl pyrophosphate |
| KLS | Kauniolide synthase |
| KO | Knock-out |
| Lc | Lactucine |
| LB | Left Border |
| LG | Linkage group = Groupe de liaison |
| Lp | Lactuopicrine |
| MEP | 2-C-méthylérythritol-4-phosphate |
| MC1 | Milieu de culture 1 |
| MC2 | Milieu de culture 2 |

| | |
|----------|---|
| MVA | Acide mévalonique |
| OGM | Organisme génétiquement modifié |
| PAL | Phénylalanine ammonialyase |
| PAM | Protospacer-adjacent motif |
| PEG | Polyéthylène glycol |
| PCR | Réaction de polymérase en chaîne |
| RB | Right Border |
| RNP | Ribonucléoprotéique |
| sgRNA | single-guide RNA |
| SSR | Marqueurs microsatellites |
| STLs | Lactones sesquiterpéniques |
| TAL | Tyrosine ammonialyase |
| TALEN | Nucléases effectrices de type activateur de transcription |
| TAS1Rs | Cellules réceptrices du goût de type 1 |
| TAS2Rs | Cellules réceptrices du goût de type 2 |
| tracrRNA | Trans-activating crRNA |
| TRCs | Cellules réceptrices du goût |
| WT | wild-type = sauvage |

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE.

| | |
|--|----|
| <u>Figure i.1.</u> Représentation des espèces du genre <i>Cichorium</i> consommées en Europe..... | 13 |
| <u>Figure i.2.</u> Modèle de la voie de biosynthèse de l'inuline [Van Laere et Van Den Ende, 2002]..... | 19 |
| <u>Figure i.3.</u> Voie de biosynthèse des composés phénoliques issus de la voie du shikimate [Câmara <i>et al.</i> , 2021]..... | 22 |
| <u>Figure i.4.</u> Voie de biosynthèse des terpènes dans les plantes [Heldt, 2005]..... | 24 |
| <u>Figure i.5.</u> Représentation des différents récepteurs permettant de distinguer les 5 saveurs. | 27 |
| <u>Figure i.6.</u> Exemple de réparations induites à la suite d'une cassure double-brin. | 36 |
| <u>Figure i.7.</u> Représentation d'un sgRNA [Miano <i>et al.</i> , 2016]..... | 38 |

CHAPITRE 1.

| | |
|--|----|
| <u>Figure 1.1.</u> Voie de biosynthèse des guaianolides impliquées dans l'amertume de la chicorée..... | 43 |
| <u>Figure 1.2.</u> Représentation schématique de la structure génomique des gènes <i>GAS</i> [Bogdanović <i>et al.</i> , 2019a]..... | 44 |
| <u>Figure 1.3.</u> Structure du gène <i>GAS-L</i> visualisée par l'outil Integrative Genome Viewer..... | 49 |
| <u>Figure 1.4.</u> Visualisation des copies 1 à 3 du gène <i>GAS-S</i> sur l'outil Integrative Genome Viewer..... | 51 |
| <u>Figure 1.5.</u> Visualisation des copies <i>GAS-S4b</i> et <i>GAS-S5</i> du gène <i>GAS-S</i> sur l'outil Integrative Genome Viewer | 52 |
| <u>Figure 1.6.</u> Arbre phylogénétique des copies du gène <i>GAS-S</i> identifiées dans différentes bases de données..... | 53 |
| <u>Figure 1.7.</u> Structure du gène <i>GAO</i> visualisée sur l'outil Jbrowse..... | 54 |
| <u>Figure 1.8.</u> Représentation des gènes <i>GAS</i> et <i>GAO</i> et des régions ciblées par CRISPR/Cas9..... | 56 |
| <u>Figure 1.9.</u> Vérification de la composition et de la qualité des librairies d'ADN de chaque composante via une puce à ADN | 57 |
| <u>Figure 1.10.</u> Contenu en STLs total dans les racines, âgées de 3 mois, des différentes composantes de chicorée | 60 |

| | |
|---|----|
| <u>Figure 1.11.</u> Arbre phylogénétique des copies du gène <i>GAS-S</i> identifiées dans différentes bases de données..... | 63 |
|---|----|

CHAPITRE 2.

| | |
|--|----|
| <u>Figure 2.1.</u> Processus de génération de chevelus racinaires de chicorée..... | 67 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| <u>Figure 2.2.</u> Représentation schématique de deux types de plasmide Ri de <i>R. rhizogenes</i> [Ozyigit <i>et al.</i> , 2013]..... | 69 |
|--|----|

ARTICLE.

| | |
|---|----|
| <u>Figure 1.</u> Schematic representation of the structure for <i>CiGAS</i> and <i>CiGAO</i> genes..... | 80 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| <u>Figure 2.</u> Examples of sequences obtained by CRISPR/Cas9 editing..... | 84 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| <u>Figure 3.</u> HPLC chromatogram at 254nm of sesquiterpene lactones in root of the wild-type chicory ChicBitter002..... | 85 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| <u>Figure 4.</u> STL content in roots of chicories according to their peak area (mUA) obtained by HPLC analysis..... | 86 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| <u>Figure 5.</u> Total sesquiterpene lactone content of roots of edited chicory regenerated from HR lines by HPLC..... | 88 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| <u>Figure 6.</u> Relationship between the total STL content and the bitterness score of chicories..... | 89 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| <u>Supplementary Figure 1.</u> Phylogenetic tree of <i>CiGAS-short</i> genes obtained by MAFFT protein alignment..... | 96 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| <u>Supplementary Figure 2.</u> Jbrowse visualization of the 3 exons-structured <i>CiGAO</i> gene..... | 97 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| <u>Supplementary Figure 3.</u> Schematic representation of the genomic organization of the contig_403_pilon..... | 97 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| <u>Supplementary Figure 4.</u> Percentage of identity matrices found in the sequence comparisons between coding regions of <i>CiGAS-short</i> | 97 |
|---|----|

| | |
|---|-----|
| <u>Supplementary Figure 5.</u> Protein sequence of the copy <i>CiGAS-S1</i> of mutant HR lines..... | 100 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>Supplementary Figure 6.</u> Protein sequence of the copy <i>CiGAS-S2</i> of mutant HR lines..... | 101 |
|---|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>Supplementary Figure 7.</u> Protein sequence of the copy <i>CiGAS-S5</i> of mutant HR lines..... | 102 |
|---|-----|

| | |
|--|-----|
| <u>Supplementary Figure 8.</u> Protein sequence of the copy <i>CiGAO</i> of mutant HR lines..... | 103 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| <u>Supplementary Figure 9.</u> Sesquiterpene lactone content of roots of edited chicory regenerated from HR lines..... | 104 |
|--|-----|

| | |
|---|-----|
| <u>Figure 2.3.</u> Séquences de lignées de chevelus racinaires obtenues par édition par CRISPR/Cas9. | 113 |
| <u>Figure 2.4.</u> Analyse par HPLC du contenu en STLs dans le latex de feuilles de chicorées mutantes (absorbance à 254nm)..... | 114 |
| <u>Figure 2.5.</u> Contenu total en STLs dans le latex des feuilles de chicorées éditées..... | 114 |
| <u>Figure 2.6.</u> Séquences des copies du gène <i>GAS-S</i> de lignées de chevelus racinaires de ChicBitter003 mutées..... | 118 |
| <u>Figure 2.7.</u> Séquences du gène <i>GAS-L</i> de lignées de chevelus racinaires de ChicBitter003 mutées. . | 118 |
| <u>Figure 2.8.</u> Séquences du gène <i>GAO</i> de lignées de chevelus racinaires de ChicBitter003 mutées..... | 119 |
| <u>CHAPITRE 3.</u> | |
| <u>Figure 3.1.</u> Processus de régénération de chicorée à partir de protoplastes. | 123 |
| <u>Figure 3.2.</u> Visualisation de protoplastes sous microscope à fluorescence. | 129 |
| <u>Figure 3.3.</u> Rendement des essais d’optimisation de transfection de protoplastes issus de la composante Chicbitter001. | 130 |
| <u>Figure 3.4.</u> Efficacité de transfection dans les différentes composantes de chicorée..... | 131 |
| <u>Figure 3.5.</u> Séquences des copies du gène <i>GAS-S</i> des plantes mutées et régénérées des protoplastes de la composante ChicBitter003. | 132 |
| <u>Figure 3.6.</u> Séquences du gène <i>GAS-L</i> des plantes mutées et régénérées de protoplastes de la composante ChicBitter003..... | 133 |
| <u>Figure 3.7.</u> Séquences du gène <i>GAO</i> des plantes mutées et régénérées de protoplastes de la composante ChicBitter003..... | 134 |

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE.

| | |
|---|----|
| <u>Tableau i.1.</u> Utilisations traditionnelles médicinales de l'espèce <i>Cichorium intybus</i> dans le monde [modifié de Street <i>et al.</i> , 2013]. | 17 |
| <u>Tableau i.2.</u> Composition (%) non exhaustive de la racine de chicorée séchée..... | 18 |
| <u>Tableau i.3.</u> Classification des terpènes en fonction de leur squelette carboné. | 24 |
| <u>Tableau i.4.</u> Lactones sesquiterpéniques identifiées dans la racine de chicorée..... | 27 |
| <u>Tableau i.5.</u> Exemples de composés responsables de l'amertume chez des plantes alimentaires. | 30 |

CHAPITRE 1.

| | |
|---|----|
| <u>Tableau 1.1.</u> Pourcentage d'identité des séquences d'ADNc des copies du gène <i>GAS-S</i> | 55 |
| <u>Tableau 1.2.</u> Variabilité allélique (%) des 5 composantes de chicorée sur 10 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs, par rapport à la chicorée Chicbitter002..... | 59 |
| <u>Tableau 1.3.</u> Comparaison de variants alléliques entre plusieurs composantes de chicorée sur 10 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs..... | 60 |
| <u>Tableau 1.4.</u> Variations nucléotidiques des exons et séquences ciblées par CRISPR/Cas9 dans différentes composantes de chicorée..... | 62 |

CHAPITRE 2.

| | |
|--|----|
| <u>Tableau 2.1.</u> Type de plasmides Ri produisant des opines et leurs gènes de biosynthèse associés. [Modifié de Vladimirov <i>et al.</i> , 2015]. | 69 |
|--|----|

ARTICLE.

| | |
|---|-----|
| <u>Table 1.</u> Overview of the mutation events in chicory transformed with <i>R. rhizogenes</i> with different constructs. | 82 |
| <u>Table 2.</u> Summary of mutations found in hairy root lines for each target of the different copies of <i>CiGAS-short</i> and for <i>CiGAO</i> genes. | 84 |
| <u>Supplementary Table 1.</u> List of oligonucleotides. | 96 |
| <u>Supplementary Table 2.</u> Correlation between individual STL and bitter score..... | 99 |
| <u>Supplementary Table 3.</u> Relationship between total STL content and bitterness score. | 100 |

| | |
|---|-----|
| <u>Tableau 2.2.</u> Liste des oligonucléotides utilisés. | 113 |
| <u>Tableau 2.3.</u> Phénotype des descendances des mutants HR3, HR10 et HR12, obtenues par autofécondation. | 117 |
| <u>Tableau 2.4.</u> Aperçu des événements de mutation induits par CRISPR/Cas9 dans la composante ChicBitter003 transformée avec <i>R. rhizogenes</i> | 120 |
| <u>CHAPITRE 3.</u> | |
| <u>Tableau 3.1.</u> Liste des amorces utilisées pour le génotypage et le séquençage. | 128 |
| <u>Tableau 3.2.</u> Représentation de l'efficacité de callogénèse des protoplastes en fonction de différentes chicorées. | 129 |
| <u>Tableau 3.3.</u> Aperçu des événements de mutation induits par CRISPR/Cas9 dans les protoplastes de la composante ChicBitter003. | 134 |
| <u>Tableau 3.4.</u> Aperçu des événements de mutation induits par CRISPR/Cas9 dans les protoplastes de la composante ChicBitter006. | 136 |

INTRODUCTION GENERALE

1. La chicorée (*Cichorium intybus* L.), une plante d'intérêt.

1.1. Taxonomie de la chicorée et culture.

La chicorée (*Cichorium intybus* L.) appartient à la famille des Astéracées, qui représente la plus grande famille de plantes parmi les angiospermes puisqu'elle est composée de plus de 23 000 espèces [Panero et Funk, 2008]. Cette diversification proviendrait de la présence caractéristique d'inflorescences attractives pour les insectes pollinisateurs, permettant l'extension de cette famille. Parmi les Astéracées, on compte de nombreuses sous-familles dont les plus abondantes sont : les *Asteroideae*, les *Carduoideae* et les *Cichorioideae*. Cette dernière sous-famille comprend le genre *Cichorium* qui regroupe 6 espèces réparties autour du globe : *Cichorium calvum*, *Cichorium botaie* et *Cichorium glandulosum* que l'on retrouve principalement en Asie et au Moyen Orient, *Cichorium spinosum*, *Cichorium endivia* L. et *Cichorium intybus* L, généralement cultivées en Europe, en Amérique ou en Asie [Bais et Ravishankar, 2001]. L'origine de la culture de *C. intybus* L. viendrait probablement du bassin méditerranéen, même si l'Asie centrale a été suggérée par certains auteurs [Zeven et De Wet, 1982 ; Vavilov, 1992]. Les trois espèces retrouvées en Europe sont reconnues pour leur amertume et sont principalement consommées en salade, crues ou cuites, ou comme ingrédient alimentaire via l'exploitation de leurs feuilles ou de leurs racines. Par exemple, les feuilles de *C. spinosum* que l'on retrouve sur les bords de la Méditerranée, sont consommées en Grèce sous le nom de « stamnagathi » (**Figure i.1**) [Kiers, 2000]. L'espèce *C. endivia* est cultivée pour la consommation de ses feuilles sous forme de salade, notamment les variétés *latifolium* et *crispum* qui se réfèrent à la chicorée scarole et à la chicorée frisée (**Figure i.1**) [Kiers, 2000 ; Bais et Ravishankar, 2001]. L'espèce *C. intybus* présente un plus grand intérêt agro-alimentaire puisqu'elle est consommée à la fois pour ses feuilles et pour sa racine. En effet, sur les 3 grands groupes de culture existants, les variétés *sylvestre* et *foliosum*, correspondant respectivement aux chicorées salade (« Pain de sucre », « Treviso », etc) et aux chicorées witloof (chicon ou endive), sont cultivées pour la consommation des feuilles, tandis que la variété *sativum*, correspondant à la chicorée industrielle, est cultivée pour l'intérêt que présente sa racine (**Figure i.1**) [Zeven et Wet, 1982 ; Kiers, 2000]. A partir de celle-ci, il est possible d'extraire une quantité importante d'inuline, un polymère de fructose très utilisé en agro-alimentaire. Ce polymère est une fibre non digérée par les enzymes de l'intestin humain, possédant un haut pouvoir sucrant mais à taux calorique bas et des capacités gélifiantes intéressantes. L'inuline est ainsi utilisée en tant que substitut au sucre et au gras, et on la retrouve aussi en tant qu'agent texturant dans de nombreux produits alimentaires [Franck, 2002 ; Leite Toneli *et al.*, 2007]. La racine de chicorée industrielle est aussi utilisée comme ingrédient pour la production de substitut de café, sans caféine, grâce à l'amertume du produit.

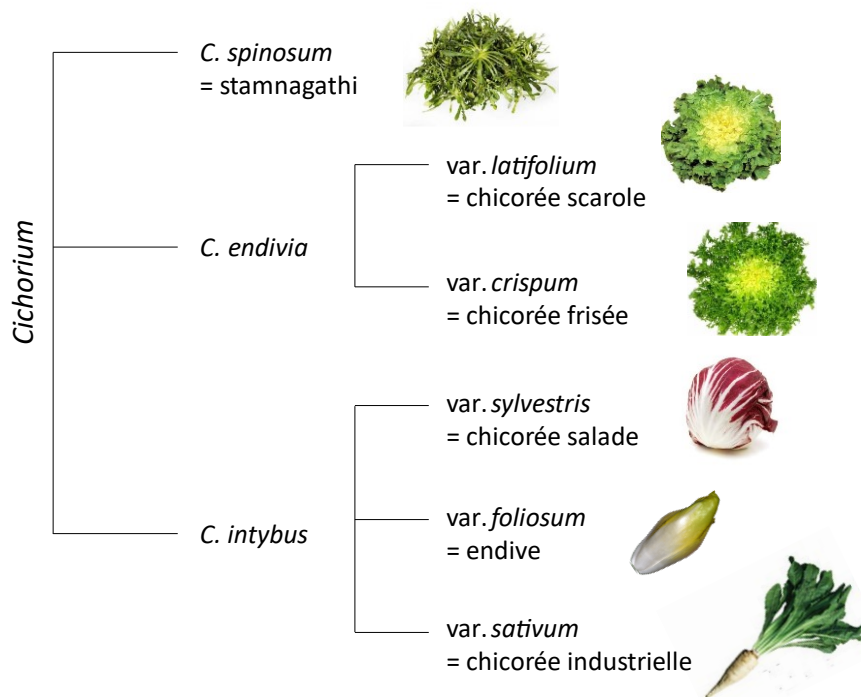


Figure i.1. Représentation des espèces du genre *Cichorium* consommées en Europe.

A l'état sauvage *C. intybus* L., que l'on nomme couramment la chicorée, est une plante pérenne poussant sur le bord des routes et des champs. Elle peut atteindre une hauteur de 1 mètre, possède une racine tubérisée et présente de nombreuses inflorescences composées de quinze à vingt fleurs bleues regroupées en capitules. Cette plante sécrète du latex grâce à des canaux laticifères, caractéristiques de beaucoup d'Astéracées [Kiers, 2000 ; Kandeler et Ullrich, 2009 ; Street *et al.*, 2013]. Lorsqu'elle est cultivée, la chicorée est une plante bisannuelle dont les graines sont semées aux alentours de mars-avril. S'en suivra une phase de croissance végétative qui va permettre l'accumulation de réserves au sein d'une racine tubérisée. Au bout de la première année de culture, une période de vernalisation doit avoir lieu afin d'induire une phase reproductive, c'est-à-dire que la chicorée doit subir un stress thermique prolongé pendant l'hiver afin de provoquer le développement d'une hampe florale au printemps et dont la floraison aura lieu entre juillet et septembre [Kiers, 2000 ; Street *et al.*, 2013 ; Mathieu *et al.*, 2020]. Pour des raisons industrielles, la racine de chicorée est récoltée après une année seulement afin d'éviter la floraison, de propager des graines non désirées pour l'année suivante, mais aussi pour éviter une perte de rendement puisque la montée en fleurs consomme les réserves de la racine de la plante.

L'espèce *C. intybus* L. possède un système d'auto-incompatibilité sporophytique, la rendant naturellement allogame, bien que quelques allèles d'auto-compatibilité puissent quand même être

présents. Afin d'obtenir différentes variétés il est donc nécessaire de passer par une reproduction croisée via des pollinisateurs. Ces caractéristiques, rendant les variétés de chicorée non homogènes et non fixées, compliquent la recherche agronomique puisque les variétés sont moins stables, toutefois, ces variations sont la raison de la robustesse de la chicorée. Ainsi, les variétés de chicorée industrielle sont des variétés-populations obtenues par inter-croisements de ce qu'on appelle des « composantes ». Ces composantes correspondent à un mélange de chicorées partageant au moins un critère agronomique d'intérêt et un pool de gènes communs. A l'aide d'inter-croisements de ces composantes, il est possible d'introduire des critères agronomiques d'intérêt qui deviendront une caractéristique de la variété et de fixer certaines fréquences alléliques.

1.2. Utilisation de la chicorée.

Bien que décrite pour la première fois en 1753, par Carl Von Linné, on retrouve des traces de l'utilisation de la chicorée à des époques bien plus anciennes. En effet, les vestiges les plus anciens datent de l'Âge de Bronze. Les premières traces écrites mentionnant l'utilisation de la chicorée ont été retrouvées dans le papyrus d'Ebers (1600 av. JC) et il semblerait que la domestication de la chicorée soit originaire de l'Égypte Antique, où elle était consommée principalement pour ses vertus médicinales [Kiers, 2000 ; Kandeler et Ullrich, 2009]. Au fil des siècles et des populations, l'usage des différentes parties de cette plante s'est diversifié et de nombreux documents permettent d'en retracer l'histoire. On retrouve notamment des mentions de traitements à base de racines de chicorée dans des travaux provenant du grec Dioscoride (25-90 apr. JC) et du romain Pline l'Ancien (23-79 apr. JC). La racine était alors utilisée principalement dans le traitement du tractus gastro-intestinal et du foie grâce à ses propriétés anti-inflammatoires [Ajasson de Grandsagne, 1832 ; Osbaldeston et Wood, 2000 ; Puhlmann et de Vos, 2020]. Les décoctions de racines, de feuilles ou de la plante entière pouvaient être utilisées comme agent contre l'hypertension ou pour un effet hépato-protecteur en Italie [Guarerra *et al.*, 2005], pour le traitement des calculs rénaux en Turquie [Sezik *et al.*, 2001] ou pour des soins d'ordre digestif en Serbie [Jaric *et al.*, 2007] et en Grèce [Hanlidou *et al.*, 2004]. D'autres utilisations ont été retrouvées à travers le monde et ont été listées sous forme de tableau par Street *et al.*, 2013 (**Tableau i.1**). Finalement, la mention de la chicorée a été retrouvée dans de nombreuses pharmacopées entre le 17^{ème} et le 18^{ème} siècle et elle a fini par être considérée comme traitement populaire jusqu'à ce que des études pharmacologiques soient réalisées et mettent en avant la présence de plus d'une centaine de métabolites spécialisés [Puhlmann et de Vos, 2020].

En plus de son utilisation médicinale, on retrouve des traces de l'usage de la chicorée comme produit alimentaire dès la Rome Antique dans le livre de recette « De re coquinaria » de Apicius (25

av. JC – 37 apr. JC) où les différentes parties de la chicorée étaient consommées sous forme de salade. C'est à partir du 18^{ème} siècle que l'utilisation de la racine de chicorée s'est multipliée, avec la production d'une poudre de racine utilisable soit comme farine après une étape de désamérisation de la plante, soit comme substitut de café grâce à sa forte amertume. La farine de chicorée a notamment permis de remplacer la farine de blé pour la production du pain lors des périodes de famine [Kops et Gevers Deijnoot, 1853]. Le café étant une denrée onéreuse et rare pour l'époque, l'utilisation de la chicorée en tant que substitut s'est démocratisée entre le 18^{ème} et 20^{ème} siècle suite au blocus continental imposé par Napoléon et aux périodes de grandes guerres [Kandeler et Ullrich, 2009 ; Puhlmann et de Vos, 2020]. Finalement, l'usage de la chicorée industrielle s'est diversifié au début du 20^{ème} siècle lorsque l'intérêt pour l'inuline a grandi. De nos jours, l'usage de la chicorée est reconnu pour la production d'inuline et pour les produits torréfiés tel que le substitut de café ou pour l'ajout d'une saveur amère dans les boissons chaudes. Cependant de nouveaux marchés s'intéressent à cette plante et on note de plus en plus de produits à base de chicorée. Par exemple, un enrichissement de yaourts avec des extraits de racines de chicorée a été réalisé [Jeong *et al.*, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017]. On peut aussi noter l'utilisation de poudre de feuilles de chicorée pour produire des biscuits apéritifs [Abo Taled *et al.*, 2017] ou de poudre de racines de chicorée pour remplacer le gras dans des steaks de bœuf [Zeny *et al.*, 2019], pour remplacer les protéines de soja dans des galettes végétales pour burgers [Twarogowska *et al.*, 2022], ou compléter en fibres des biscuits [Ivanišová *et al.*, 2020]. De la farine de chicorée a aussi permis l'élaboration de crackers [Massoud *et al.*, 2009], de produits de panification [Bossard *et al.*, 2005 ; Volvoka *et al.*, 2019], de gâteaux [Ferreira *et al.*, 2016], et de biscuits apéritifs à la suite d'un mélange avec de la farine de riz [Bokić *et al.*, 2022]. Pour chacun de ses produits, il a pu être observé une amélioration de la valeur nutritionnelle, de la texture et des propriétés de cuisson, une réduction de l'apport en sucre et en gras, ainsi qu'une augmentation de l'apport en fibres. Malheureusement, l'amertume que provoque la chicorée oblige à en limiter la quantité utilisée. Suite à différentes analyses sensorielles de produits élaborés à base de chicorée, afin de tester leur acceptabilité par des panels de consommateurs, il a été montré que l'acceptabilité des produits diminuait rapidement lors de l'augmentation des quantités de chicorée utilisées. Ainsi, pour la production de yaourt enrichi en chicorée, seulement 2 à 4% d'extrait de racine de chicorée ont pu être ajoutés au produit final [Jeong *et al.*, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017]. Pour la production de biscuits ou de crackers, il semblerait que le meilleur compromis entre texture et goût amer soit un ajout de 1 à 3% de poudre de racines ou de feuilles de chicorée [Abo Taled *et al.*, 2017 ; Ivanišová *et al.*, 2020]. Enfin, dans le cadre de produits de panification, une utilisation de farine de racine de chicorée au taux de 5% est la limite haute à laquelle la perception de l'amertume reste tolérable [Bossard *et al.*, 2005 ; Volvoka *et al.*, 2019]. Cependant, si l'on souhaite bénéficier des bienfaits de la chicorée, il est nécessaire d'apporter des quantités plus importantes de chicorées à tous ces produits.

Tableau i.1. Utilisations traditionnelles médicinales de l'espèce *Cichorium intybus* dans le monde [modifié de Street *et al.*, 2013].

| Pays | Usage traditionnel | Partie de la plante | Préparation | Référence |
|---------------------------|--|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Afghanistan | Paludisme | Racines | Extraction aqueuse | Bischoff <i>et al.</i> , 2004 |
| Bosnie-Herzégovine | Diarrhée, renforcement de la prostate et d'autres organes reproducteur, cancer pulmonaire, gueule de bois, purification du tractus biliaires | Parties aériennes, fleurs, racines | Non renseigné | Šarić-Kundalić <i>et al.</i> , 2011 |
| | Trouble du foie, spasmodique, cholestérol, antiseptique | Parties aériennes | Décoction | Hanlidou <i>et al.</i> , 2004 |
| Bulgarie | Stimulant de la cholagogue pour la sécrétion gastrique, hypoglycémique | Racines, parties aériennes | Décoction | Leporatti et Ivancheva, 2003 |
| Inde | Trouble du foie | Graines | Non renseigné | Ahmed <i>et al.</i> , 2003 |
| | Diabète | Plantes entières | Non renseigné | Pushparaj <i>et al.</i> , 2007 |
| | Jaunisse, hypertrophie du foie, goutte, rhumatismes | Racines | Décoction | Pushparaj <i>et al.</i> , 2007 |
| Iran | Soulagement de la toux | Non renseigné | Non renseigné | |
| | Digestive, stomacnique, dépurative, cholérétique, laxative, hypotension, tonique, antipyrétique | Plantes entières | Infusion, décoction | Miraldi <i>et al.</i> , 2001 |
| | Purification du sang | Feuilles | Non renseigné | Pieron, 2000 |
| | Hypertension | Feuilles | Décoction | Guarrera <i>et al.</i> , 2005 |
| Italie | Purification du sang, artériosclérose, anti-arthrite, antispasmodique, digestive | Feuilles, racines | Décoction | Loi <i>et al.</i> , 2005 |
| | Dépurative | Verticilles, parties aériennes | Décoction | Pieron <i>et al.</i> , 2002 |
| | Cholérétique, hépato-protecteur contre la jaunisse, laxatif doux, hypoglycémique | Feuilles | Décoction, feuilles fraîches écrasées | Leporatti et Ivancheva, 2003 |
| Jordanie | Hémorragie interne, sédatif pour la typhoïde | Plantes entières | Cuisiné | Lafi <i>et al.</i> , 2022 |
| Maroc | Maladie rénale | Parties aériennes, racines | Non renseigné | Jouad <i>et al.</i> , 2001 |
| | Troubles rénaux, diabète | Plantes entières | Décoction | El-Hilaly <i>et al.</i> , 2003 |
| Pakistan | Diabète | Racines | Décoction | Ahmad <i>et al.</i> , 2009 |
| Pologne | Troubles digestifs et manque d'appétit | Racines | Infusion | Łuczaj, 2012 |
| Serbie | Diarrhée | Fleurs | Infusion | Šavikin <i>et al.</i> , 2013 |
| | Diurétique, digestive, laxative, anti-inflammatoires, problèmes de foie, réduction de la glycémie | Racines | Décoction, infusion | Jarić <i>et al.</i> , 2007 |
| | Cholagogue, digestive, hypoglycémique | Parties aériennes, racines | Non renseigné | Kokoska <i>et al.</i> , 2002 |
| Afrique du Sud | Jaunisse, tonique | Feuilles, tiges, racines | | Wyk <i>et al.</i> , 1997 |
| Turquie | Cancers, calculs rénaux | Racines | Décoction | Sezik <i>et al.</i> , 2001 |
| | Cicatrisation des plaies | Feuilles | Pommade | Sezik <i>et al.</i> , 2001 |
| | Hémorroïdes, troubles urinaires | Parties aériennes | Infusion | Tetik <i>et al.</i> , 2013 |

Tableau i.2. Composition (%) non exhaustive de la racine de chicorée séchée.

| Classification | Exemples | Composition (%) | References |
|---------------------------------|---|------------------|---|
| Protéines, acides aminés | NP | 3,8-7% | Pazola, 1987 ; Massoudet <i>al.</i> , 2009 ; Juskiwicz <i>et al.</i> , 2011 ; Zarroug <i>et al.</i> , 2016 ; Khalaf <i>et al.</i> , 2018 |
| Cendres | | 3,3-8,96% | Pazola, 1987 ; Massoudet <i>al.</i> , 2009 ; Juskiwicz <i>et al.</i> , 2011 ; Zarroug <i>et al.</i> , 2016 ; Khalaf <i>et al.</i> , 2018 |
| Minéraux | Calcium, fer, magnésium, sodium, potassium, zinc, cuivre, etc... | 0,37-1% | Massoudet <i>al.</i> , 2009 ; Zarroug <i>et al.</i> , 2016 |
| Vitamines | NP | NP | |
| Lipides | Acide palmitique, acide linoléique, acide linoléique, etc.. | 1,5%-3% | Pazola, 1987 ; Juskiwicz <i>et al.</i> , 2011 ; Khalaf <i>et al.</i> , 2018 |
| Carbohydrates | Fibres : cellulose, hémicellulose, pectine Sucres : inuline, saccharose, monosaccharides | 5-6% 23-84% | Pazola, 1987 ; Massoudet <i>al.</i> , 2009 Pazola, 1987 ; Massoudet <i>al.</i> , 2009 ; Juskiwicz <i>et al.</i> , 2011 ; Denev <i>et al.</i> , 2014 ; Zarroug <i>et al.</i> , 2016 |
| Composés volatiles | Octane, n-nonanal, (2E,4Z)-decadienal, (E)- β -farnesene, n-hexadecane, tetradecanal, etc.. | 0,02-0,04% (v/w) | Judžentienė et Būdienė, 2008 |
| Acides organiques | Citrate, fumarate, malate, acidetartarique, acide acétique, etc.. | 0,14-3% | Pazola, 1987 ; Willeman, 2016 |
| Composés phénoliques | Flavonoïdes, acides phénoliques, tannins, coumarines | 0,007%-0,63% | Spina <i>et al.</i> , 2008 ; Milala <i>et al.</i> , 2009 ; Juskiwicz <i>et al.</i> , 2011 ; Denev <i>et al.</i> , 2014 ; Zarroug <i>et al.</i> , 2016 ; Khalaf <i>et al.</i> , 2018 |
| Composés terpéniques | Guaianolides, germacranolides, eudesmanolides | 0,1-0,8% | Pazola, 1987 |

La composition est indiquée en % calculé à partir de la quantité en g/100g de poids sec, sauf pour les composés volatiles qui ont été calculés à partir d'un volume sur la base du poids sec. NP = non précisé par les auteurs.

1.3. Composition de la racine de chicorée.

Depuis plusieurs années l'amélioration de la santé semble passer par l'assiette. De nombreux articles citent les bienfaits de la consommation d'au moins 5 fruits et légumes par jour ou encore de réduire notre consommation de produits animaux, ainsi on observe un changement dans la manière de consommer chez de plus en plus de personnes. Les industriels s'étant aussi adaptés, on voit de plus en plus arriver dans nos rayons de magasins, de nouveaux produits alimentaires reflétant les tendances gustatives du moment. Parmi ces nouveaux produits, on retrouve des boissons et des aliments fonctionnels dont le marché global mondial était estimé à 189,5 milliards de dollars américains en 2021 [Spherical Insight & Consulting, 2022]. La notion d'aliment fonctionnel est définie par Roberfroid [2000] comme « un aliment qui démontre de manière satisfaisante, et dans des quantités de consommation non exagérées, qu'il a un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions de l'organisme, au-delà des effets nutritionnels adéquats, de manière à contribuer à l'amélioration de la santé et du bien-être et/ou la réduction du risque de maladies ». Grâce à sa composition nutritionnelle, la chicorée est une source de substances bioactives lui conférant un rôle d'aliment ou d'ingrédient fonctionnel (Liste non exhaustive **Tableau i.2**). Cette composition est sujette à variation pour différentes raisons comme le cultivar, les conditions et techniques de culture, les conditions et la durée de stockage ou encore la méthode de séchage ou d'extraction de la racine de chicorée. Toutefois, la majorité des publications scientifiques s'accordent pour dire que ce sont l'inuline et les divers métabolites spécialisés retrouvés dans la racine qui jouent un rôle clé dans les effets santé de la chicorée [Puhlmann et de Vos, 2020].

1.3.1. L'inuline.

Même si la découverte de l'inuline remonte au début des années 1800, par le chimiste allemand Valentin Rose à partir de racines de *Inula helenium*, la structure de ce polymère ne sera pas élucidée avant 1950 [Hirst, 1959 ; Stevens *et al.*, 2001]. En 1968, Edelman & Jefford [1968] propose un modèle de biosynthèse de l'inuline à partir d'une étude réalisée sur *Helianthus annuus* : à partir d'un saccharose qui serait transféré du cytosol vers la vacuole de la plante, deux enzymes permettraient alors de former une chaîne d'inuline : la sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase (1-SST) et la fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT). Dans un premier temps, la 1-SST permettrait le transfert d'un fructose entre deux molécules de saccharose pour former un trisaccharide 1-kestose. Dans un second temps, la 1-FFT interviendrait pour transférer un fructose depuis le trisaccharide 1-kestose vers une molécule de saccharose ou de fructane et répéterait l'opération jusqu'à formation d'une chaîne d'inuline (**Figure i.2**). Ce modèle a été validé chez la chicorée par Van den Ende et Van Laere [1996] lors de l'isolement des gènes impliqués dans cette voie enzymatique. Dans la chicorée,

l'inuline est constituée de 2 à 60-70 unités de fructose liées par des liaisons $\beta(2,1)$ et se terminant généralement par une molécule de glucose [Flamm *et al.*, 2001 ; Roberfroid, 2007].

L'inuline est un polymère de réserve ayant la fonction de cryoprotecteur dans les plantes [Hinch *et al.*, 2000]. Elle est principalement connue pour son utilisation en agro-alimentaire où cette fibre alimentaire non digestible [Gibson et Roberfroid, 1995], possédant un effet prébiotique, est régulièrement utilisée en remplacement de matières grasses ou de sucre [Sołowiej *et al.*, 2015 ; Tsatsaragkou *et al.*, 2021].

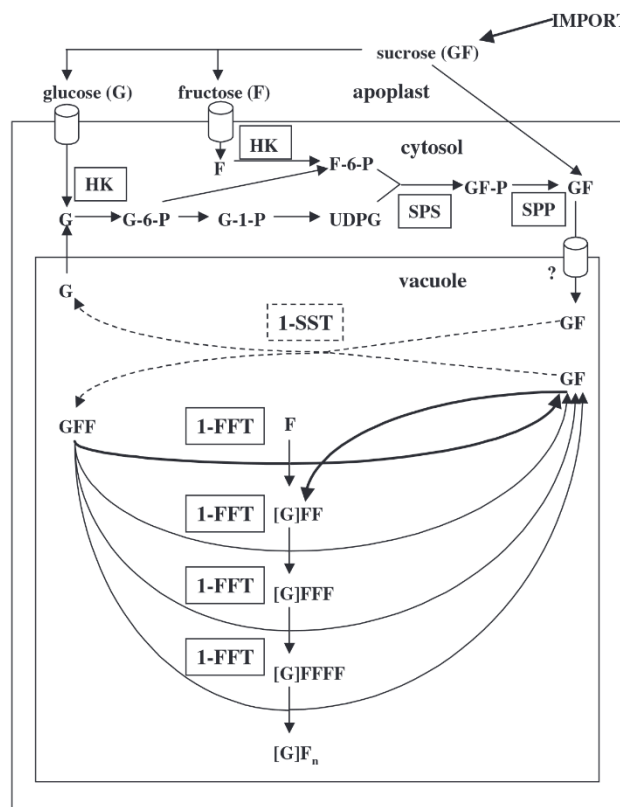


Figure i.2. Modèle de la voie de biosynthèse de l'inuline [Van Laere et Van Den Ende, 2002]. 1-SST : sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase ; 1-FFT : fructane:fructane 1-fructosyltransférase ; F-6-P : Fructose 6-phosphate ; G-1-P : glucose 1-phosphate ; G-6-P : glucose 6-phosphate ; HK : hexokinase ; SPP : sucrose phosphate phosphatase ; SPS : sucrose phosphate synthétase.

1.3.2. Les métabolites spécialisés.

Produits à partir d'éléments provenant du métabolisme primaire, on estime qu'il existe entre 200 000 à 1 million de métabolites spécialisés produits par les plantes [Dixon et Strack, 2003 ; Afendi *et al.*, 2012]. Ces composés ne sont pas directement impliqués dans les processus essentiels à la survie des plantes mais jouent un rôle dans l'adaptation et la réponse de ces dernières à leur environnement. En outre, les métabolites spécialisés permettent de repousser les attaques d'insectes et d'herbivores, régulent les interactions avec d'autres plantes et microbiotes environnants, génèrent des signaux

attractifs pour les pollinisateurs par la diffusion de composés volatiles ou la production de pigments colorés, ou encore protègent des stress abiotiques tels que les UVs [Piasecka *et al.*, 2015 ; Wouters *et al.*, 2016 ; Lin, 2017]. On les retrouve aussi dans de nombreuses applications industrielles humaines telles que l'élaboration de pigments, de cosmétiques, de parfums et d'huiles essentielles, d'herbicides, pour la conservation des aliments ou encore dans l'industrie pharmaceutique [Gupta et Gulrajani, 1993 ; Jeschke *et al.*, 2011 ; Nirmala *et al.*, 2011 ; Lin, 2017 ; D'Amelia *et al.*, 2021]. Les métabolites spécialisés sont généralement divisés en 3 classes, en fonction de leur structure chimique : les composés azotés ou sulfurés, les composés phénoliques et les composés terpéniques. Dans le cadre de la chicorée, ce sont principalement ces deux dernières classes que l'on retrouve majoritairement.

Les composés phénoliques

A l'heure actuelle, on compte plus de 8 000 composés phénoliques identifiés [Ahmed *et al.*, 2017] dans de nombreux organismes. Ces composés sont caractérisés par des groupements hydroxyles associés à un ou plusieurs cycles aromatiques et peuvent être divisés en 2 groupes : les flavonoïdes (regroupant les anthocyanidines, chalcones, les flava-3-ols, flavanones, les flavones, les flavonols et les isoflavones) et les non-flavonoïdes (regroupant les acides phénoliques, les acides hydroxycinnamiques, les lignanes, les stilbènes et les tanins) [Ahmed *et al.*, 2017 ; Câmara *et al.*, 2021].

Dans les plantes, ces composés sont formés via la voie du shikimate à partir de 2 acides aminés aromatiques : la tyrosine et la phénylalanine. Dans un premier temps, les enzymes phénylalanine ammonialyase (PAL) et tyrosine ammonialyase (TAL) vont intervenir pour convertir les acides aminés en divers composés du groupe des non-flavonoïdes jusqu'à former du coumaroyl-CoA, un métabolite clé dans cette voie de biosynthèse. A partir de coumaroyl-CoA, une chalcone synthase prend le relais pour produire des chalcones qui seront isomérisées en divers composés du groupe des flavonoïdes (**Figure i.3**) [Saltveit, 2017, Câmara *et al.*, 2021].

Même si les composés phénoliques sont présents dans l'entièreté de la plante de chicorée, ils restent plus abondants dans les feuilles. En effet, l'analyse de la composition des racines et des feuilles de chicorée par Rees et Harbone [1985] a permis de révéler la présence de nombreux composés phénoliques tels que des flavonoïdes, des coumarines mais aussi des acides hydroxycinnamiques et un acide phénolique. Dans un premier temps, seuls l'acide chicorique et l'acide caféique, acide hydroxycinnamique et acide phénolique respectivement, ont été identifiés dans la racine de chicorée. Ces recherches ont été complétées en 1987 par Clifford *et al.*, grâce à l'identification d'esters d'acide caféique appartenant aux groupes des acides hydroxycinnamiques. Ainsi, la présence d'acide 3-cafféoylquinique (3-CQA), de 4-CQA, de 5-CQA, de 3,4-diCQA, de 3,5-diCQA et de 4,5-diCQA a été mise en évidence dans les racines de chicorée. Pour l'ensemble de ces esters d'acide caféique, on parle

généralement « d'acides chlorogéniques ». D'autres études ont aussi permis l'identification d'une vingtaine de composés phénoliques, majoritairement des acides phénoliques même si quelques flavanols, tels que le gallate d'épigallocatechine, ont pu être mis en évidence dans les racines [Spina *et al.*, 2008 ; Massoud *et al.*, 2009 ; Khalaf *et al.*, 2018].

Les composés phénoliques sont connus pour avoir différents rôles dans la plante tels que la pigmentation, la défense contre les maladies ou les stress abiotiques mais ils ont été principalement étudiés pour leurs effets pharmacologiques chez l'Homme. Dans la chicorée, diverses bio-activités ont été attribuées aux composés phénoliques. Parmi une liste non exhaustive d'effets, il a été montré que les acides hydroxycinnamiques possèdent une activité antioxydante [Dalar et Konczak, 2014 ; Jurgoński *et al.*, 2012], un effet hépatoprotecteur [Zhang *et al.*, 2014] et jouent un rôle dans la régulation glycémique [Azay-Milhau *et al.*, 2013]. Des effets anti-inflammatoires ont, par ailleurs, été démontrés pour la cyanidine-3-O-(6"-malonyl- β -glucopyranoside) qui est une anthocyanine caractérisée dans les feuilles de chicorée [Mulabagal *et al.*, 2009]. Des études ont aussi démontré le pouvoir antimicrobien des extraits de composés phénoliques [Verma *et al.*, 2013 ; Khalaf *et al.*, 2018 ; Bernard *et al.*, 2020] ainsi qu'un effet répulsif de la cichoriine, une coumarine produite dans les feuilles de chicorée, sur *Schistocerca gregaria* en 1985 par Rees et Harbone.

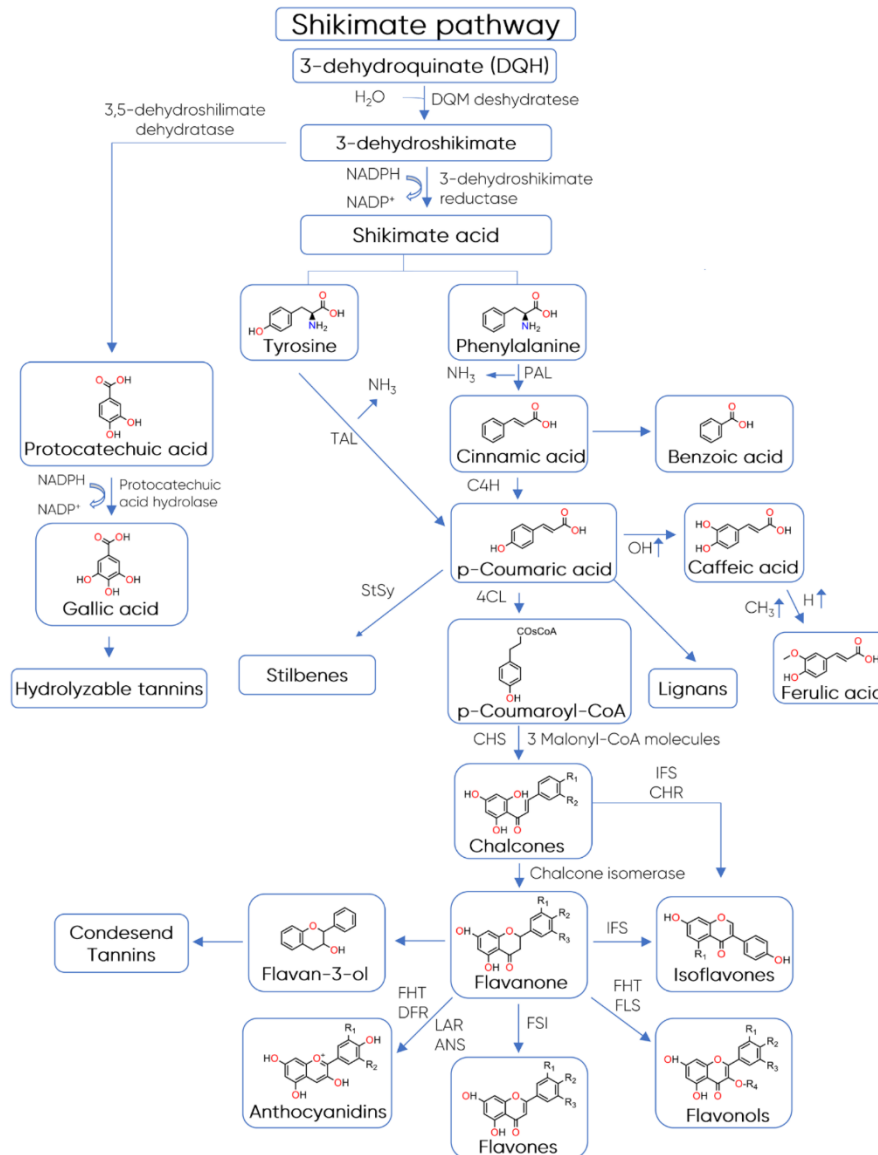


Figure i.3. Voie de biosynthèse des composés phénoliques issus de la voie du shikimate [Câmara et al., 2021]. 4CL : 4-coumaryl : CoA ligase ; ANS : anthocyanidin synthase ; C4H : acide 4-hydroxylase ; CHR : chalcone reductase ; CHS : chalcone synthase ; DFR : dihydroflavanone reductase ; FHT : flavanone hydroxytransferase ; FLS : flavonol synthase ; FSI : flavanone synthase ; IDS : isoflavanone synthase ; LAR : leucoanthocyanidin synthase ; PAL : phenylalanine ammonia lyase ; StSy : Stilbène synthase ; TAL : tyrosine ammonia lyase.

Les composés terpéniques

Avec plus de 40 000 composés identifiés, les terpènes font partie de la classe la plus importante des métabolites spécialisés [Aharoni et al. 2005]. Ils sont constitués d'une ou plusieurs unités d'isoprène et ont pour précurseur l'isopentényl pyrophosphate (IPP) ou son isomère le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Ils sont classés en fonction du nombre d'unités isoprène qu'ils contiennent [Petrović et al., 2019] (**Tableau i.3**). Lorsque les terpènes ont leur squelette modifié ou réarrangé par l'addition d'un groupe fonctionnel ou d'une structure, ceux-ci sont alors qualifiés de terpénoïdes.

Tableau i.3. Classification des terpènes en fonction de leur squelette carboné.

| Squelette carboné | Nom | Nombre d'isoprène |
|-------------------|---------------|-------------------|
| C5 | Hémiterpène | 1 |
| C10 | Monoterpène | 2 |
| C15 | Sesquiterpène | 3 |
| C20 | Diterpène | 4 |
| C25 | Sesterpène | 5 |
| C30 | Triterpène | 6 |
| C35 | Sesquarerpène | 7 |
| C40 | Tétraterpène | 8 |
| C > 40 | Polyterpène | + de 8 |

Les composés terpéniques peuvent être formés à partir de 2 voies : la voie de l'acide mévalonique (MVA), opérant principalement dans le cytosol, le réticulum endoplasmique et les peroxyosomes des eucaryotes et la voie du 2-C-méthylérythritol-4-phosphate (MEP), opérant dans les plastes et chez la plupart des bactéries [Singh et Sharma, 2015 ; Wang *et al.*, 2019]. Même si quelques études montrent la présence d'échanges entre la voie du MEP et la voie du MVA [Aharoni *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2011], on considère généralement que les monoterpènes et les diterpènes sont produits par la voie plastidiale tandis que les sesquiterpènes et les triterpènes sont produits par la voie cytosolique. Chez la chicorée, on retrouve majoritairement des sesquiterpènes associés à un groupement α -méthylène- γ -lactone (ou lactone sesquiterpéniques ou STLs), produits par la voie du mévalonate. Le MVA sert de précurseur à l'IPP ou le DMAPP dont la condensation permet d'obtenir un squelette à 10 carbones : le géranyl diphosphate (GPP). A partir de cette molécule résultante, l'ajout d'une nouvelle molécule d'IPP permet la formation de farnésyl diphosphate (FPP), le précurseur des sesquiterpènes (**Figure i.4**) [Habtemariam, 2019 ; Petrović *et al.*, 2019]. Une série de réarrangements et de cyclisations du FPP est ensuite réalisée par des sesquiterpène synthases, produisant toute une variété de composés dont des guaianolides, eudesmanolides et germacranolides retrouvés chez la chicorée [Seaman, 1982 ; Durairaj *et al.*, 2019].

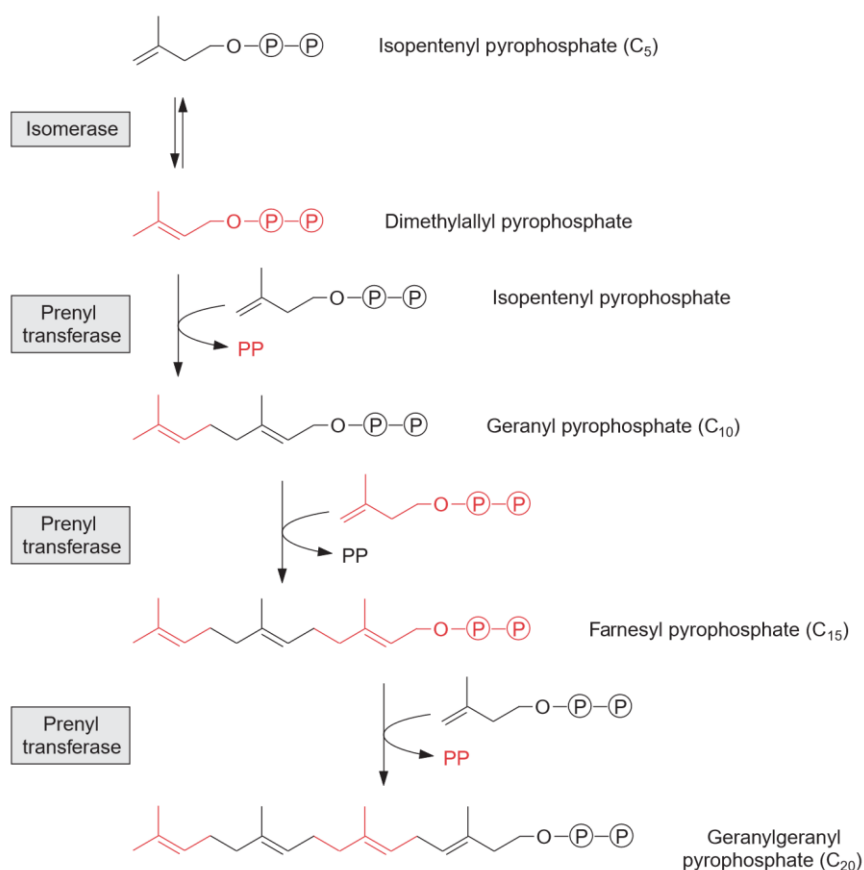


Figure i.4. Voie de biosynthèse des terpènes dans les plantes [Heldt, 2005].

Plus d'une cinquantaine de STLs ont été identifiées dans le genre *Cichorium* [Akber Aisa *et al.*, 2020], mais seules 18 d'entre elles ont été décrites dans la racine ou le latex racinaire de *C. intybus*. Parmi ces 18 STLs, on retrouve majoritairement des guaianolides ainsi que quelques germacranolides et eudesmanolides. Les guaianolides sont formées selon une voie de biosynthèse partiellement caractérisée débutant par la cyclisation du FPP en germacrène A via l'enzyme germacrène A synthase [de Kraker *et al.*, 1998], qui est ensuite oxydée en son acide par l'enzyme germacrène A oxydase [Nguyen *et al.*, 2010]. Cette molécule est ensuite convertie en costunolide par la costunolide synthase [Liu *et al.*, 2011], puis des kauniolide synthases prennent le relais pour former la kauniolide [Cankar *et al.*, 2022]. Les étapes suivant la formation de kauniolide sont encore méconnues mais elles aboutissent à la production d'une quinzaine de STLs, comprenant la lactucine (Lc), la 8-désoxylactucine (dLc), la lactucopicrine (Lp) et leurs formes 11(S),13-dihydro-, oxalatées ou glycosylées. La liste des STLs retrouvées dans la racine de *C. intybus* est résumée dans le **tableau i.4**.

Les terpénoïdes sont principalement connus pour leur activité de défense de la plante contre des herbivores ou des pathogènes et pour l'émission de composés volatiles. Chez la chicorée, la majorité des STLs extraits à partir des feuilles ou des racines ont démontré, entre autres, des effets

anti-malaria [Bischoff *et al.*, 2004], anti-inflammatoire [Cavin *et al.*, 2005 ; Ripoll *et al.*, 2007], hépatoprotecteur [Ahmed *et al.*, 2008], antiparasitaire [Foster *et al.*, 2011 ; Peña-Espinoza *et al.*, 2015 ; Peña-Espinoza *et al.*, 2017], antifongique [Mares *et al.*, 2005] ou encore une activité répulsive contre certains insectes [Rees et Harbone, 1985].

1.4. L'amertume de la chicorée.

Malgré son utilisation ancestrale, ses nombreux effets sur la santé et son potentiel rôle d'ingrédient fonctionnel, la principale caractéristique de la chicorée retenue par le grand public est son amertume. Dans le genre *Cichorium*, il est décrit que l'amertume est due à la présence des STLs dans la plante fraîche. Ce postulat a d'ailleurs été démontré, en 1990, avec deux études mettant en œuvre des analyses sensorielles. D'une part, l'équipe de Van Beek *et al.* [1990] a étudié les racines de *C. intybus* L. et a réalisé une purification de six STLs dans le but de les utiliser pour une analyse sensorielle. Le test gustatif de ces six STLs a permis l'attribution d'un seuil de perception pour chacune d'entre elles. Un seuil de perception bas signifiant qu'une concentration moins importante est nécessaire pour percevoir la molécule et donc que cette molécule est plus amère. Ces analyses ont montré que la lactucine (Lc), avec un seuil de perception de 1,7 ppm, était la moins amère tandis que la lactucopicrine (Lp) et la 11(S),13-dihydrolactucopicrine (DHLp) étaient considérées comme les plus amères avec des seuils de perception de 0,5 et 0,2 ppm, respectivement. D'autre part, l'équipe de Price *et al.* [1990] ayant réalisé une étude sur des feuilles de *C. intybus* L., a aussi établi une corrélation positive entre la présence de STLs et l'amertume après dégustation de feuilles de chicorée et dosage de leur contenu en STLs. La molécule la plus amère a aussi été estimée grâce à cette analyse sensorielle mais contrairement à l'étude précédente, c'est un glycoside de lactucine qui a été désigné comme la molécule majoritairement contributrice de l'amertume. D'autres études ont démontré l'implication des STLs dans l'amertume. Par exemple, Schenck et Graf [1939] ont établi la valeur d'amertume de la Lc et de la Lp de *Lactuca virosa* par analyse sensorielle du jus de la plante et ont démontré que la lactucopicrine est plus amère que la lactucine. Yanagisawa et Misaka [2022] ont réalisé une étude sensorielle en utilisant un système *in vitro* grâce à l'expression d'un récepteur de l'amertume, nommé TAS2R46, par des cellules humaines. En appliquant différentes concentrations de Lc, Lp, 11(S),13-dihydrolactucine (DHLc) et DHLp aux cellules, une réponse dose-dépendante est observée et une réaction plus vive est obtenue pour la DHLp et la Lp. L'ensemble de ces données semblent confirmer les premières observations réalisées par Van Beek *et al.* [1990].

Tableau i.4. Lactones sesquiterpéniques identifiées dans la racine de chicorée.

| Groupe | Molécules | Références |
|-----------------------|---|---|
| Guaianolide | ixérisoside D | Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | Lactucine | Dolejs <i>et al.</i> , 1958 ; Leclercq, 1984 ; Pyrek, 1985 ; VanBeek <i>et al.</i> , 1990 |
| | Lactucine-15-oxalate | Sessa <i>et al.</i> , 2000 ; Bogdanović <i>et al.</i> , 2019b |
| | 11(S),13-dihydrolactucine | Van Beek <i>et al.</i> , 1990 ; Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | 11(S),13-dihydrolactucine-15-glycoside (Cichorioside B) | Seto <i>et al.</i> , 1988 ; Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | 8-déoxylactucine | Lederq, 1984 ; Pyrek, 1985 ; Seto <i>et al.</i> , 1988 ; VanBeek <i>et al.</i> , 1990 ; Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | 8-déoxylactucine-15-oxalate | Sessa <i>et al.</i> , 2000 ; Bogdanović <i>et al.</i> , 2019b |
| | 8-déoxylactucine-15-glycoside (Crepidiaside A)* | Malarz <i>et al.</i> , 2013 |
| | 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine (jacqueline) | Pyrek, 1985 ; VanBeek <i>et al.</i> , 1990 ; Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine-15-glycoside (Crepidiaside B) | Seto <i>et al.</i> , 1988 ; Kisiel et Zielińska, 2001 |
| Germacranolide | Lactuopicrine | Leclercq, 1984 ; Pyrek, 1985 ; VanBeek <i>et al.</i> , 1990 ; Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | Lactuopicrine-15-oxalate | Sessa <i>et al.</i> , 2000 ; Bogdanović <i>et al.</i> , 2019b |
| | 11(S),13-dihydrolactuopicrine | Van Beek <i>et al.</i> , 1990 ; Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | Cichorioside C | Seto <i>et al.</i> , 1988 |
| Eudesmanolide | Sonchuside A | Seto <i>et al.</i> , 1988 ; Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | Cichoriolide A | Seto <i>et al.</i> , 1988 |
| | Magnolialide | Kisiel et Zielińska, 2001 |
| | Sonchuside C | Seto <i>et al.</i> , 1988 |

* Composé identifié dans des chevelus racinaires

2. L'amertume, une saveur souvent mal aimée.

2.1. La perception des saveurs et l'amertume.

Le goût joue un rôle important dans l'alimentation. Il permet d'apprécier ou non un repas mais aussi d'attribuer des saveurs aux aliments. Ces saveurs sont généralement évoquées au nombre de cinq : le sucré, le salé, l'amer, l'acide et l'umami. La détection de ces saveurs passe par des cellules réceptrices du goût (ou TRCs pour taste-receptor cells) regroupées en clusters dans les papilles gustatives le long de la langue et du palais [Krasteva-Christ *et al.*, 2020]. Chaque saveur est reconnue par des TRCs classés en fonction de leur morphologie. Les TRCs de type I et III sont des récepteurs ionotropes (récepteurs transmembranaires dotés d'un canal ionique s'ouvrant lors de la reconnaissance d'un ligand) capable de reconnaître le goût salé [Vandenbeuch *et al.*, 2008 ; Chandrashekar *et al.*, 2010] et l'acide [Tomchik *et al.*, 2007] respectivement (**Figure i.5**). Les saveurs sucrée, amère et umami sont perçues par des TRCs de type II (récepteurs métabotropes couplés à une protéine-G, changeant de conformation lors de la reconnaissance d'un ligand) [Adler *et al.*, 2000 ; Chandrashekar *et al.*, 2000 ; Nelson *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002 ; Nelson *et al.*, 2002] (**Figure i.5**). Ces récepteurs couplés aux protéines G sont étudiés depuis de nombreuses années pour élucider les différentes voies permettant de différencier les saveurs sucrée, amère et umami. On estime que les TRCs de type II peuvent être divisés en 2 sous-groupes : les récepteurs de goût de type 1 (ou TAS1Rs pour type 1 taste receptors) capables de percevoir le sucré [Nelson *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2002 ; Ohkuri *et al.*, 2009] et l'umami [Li *et al.*, 2002 ; Nelson *et al.*, 2002], et les récepteurs de goût de type 2 (ou TAS2Rs) correspondant aux récepteurs de l'amertume [Adler *et al.*, 2000 ; Chandrashekar *et al.*, 2000].

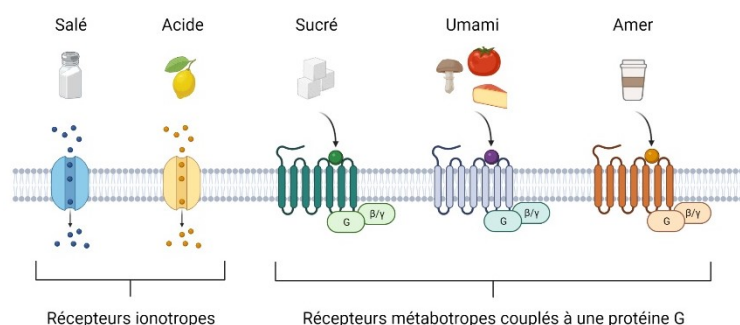


Figure i.5. Représentation des différents récepteurs permettant de distinguer les 5 saveurs.

Pour le moment, 25 récepteurs TAS2Rs codés par une famille de gènes du même nom ont été identifiés chez l'humain [Behrens *et al.*, 2007]. Parmi ces récepteurs, certains ont la capacité de s'activer uniquement en présence de ligands spécifiques, par exemple le récepteur hTAS2R3 réagit à

la chloroquine [Di Pizio et Niv, 2015], tandis que d'autres comme les récepteurs hTAS2R14, hTAS2R10 et hTAS2R46, peuvent interagir avec une large variété de substances amères appartenant autant à la classe des phénylpropanoïdes, qu'aux alcaloïdes ou aux terpénoïdes [Behrens *et al.*, 2004 ; Brockhoff *et al.*, 2007 ; Intelman *et al.*, 2009 ; Roland *et al.*, 2011 ; Lossow *et al.*, 2016]

2.2. L'amertume chez les végétaux.

Bien que le goût soit très culturel et dépendant des habitudes alimentaires, il est traditionnellement admis que la détection de ces cinq saveurs a pour but d'apporter des informations sur le contenu nutritif mais aussi d'évaluer l'absence de danger lors de l'ingestion d'aliment. C'est notamment le rôle des récepteurs de l'amertume de provoquer une réaction de rejet lors de l'ingestion de composés toxiques [Garcia et Hankins, 1975 ; Grill et Norgen, 1978 ; Travers et Norgen, 1986].

Dans le monde végétal, l'amertume est généralement attribuée aux métabolites spécialisés produits par de nombreuses plantes alimentaires. Ces plantes appartiennent à diverses familles telles que *Apiaceae*, *Asparagaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Cannabaceae*, *Capparaceae*, *Cucurbitaceae*, *Ericaceae*, *Fabaceae*, *Juglandaceae*, *Oleaceae*, *Pedaliaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, *Sterculiaceae*, *Theaceae*, ou encore *Vitaceae*. Le **tableau i.5** liste de manière non exhaustive les plantes alimentaires amères et les nombreux composés responsables de cette amertume. Ainsi on retrouve des alcaloïdes, des glucosinolates, des composés phénoliques ou encore des composés terpéniques. Afin de déterminer l'implication de ces composés dans l'amertume des plantes, les études ont généralement eu recours à des analyses sensorielles en consommant soit une partie de la plante, soit les molécules supposées amères et préalablement isolées. Cependant, l'analyse sensorielle n'étant pas toujours réalisable, des alternatives ont été développées comme l'utilisation d'un système cellulaire exprimant les récepteurs TAS2R [Brockhoff *et al.*, 2007] ou l'utilisation de bases de données comme BitterDB ou BitterPredict [Dagan-Wiener *et al.*, 2017 ; Dagan-Wiener *et al.*, 2019]. Malgré ces méthodes et outils, l'amertume reste parfois difficile à établir. En effet, elle peut être due à la présence d'un seul composé présent en grande quantité dans une plante ou à l'association de plusieurs composés présents en petites quantités. De plus, il est possible qu'un composé perçu comme amer dans une plante ne le soit pas dans une autre suite à la présence d'autres composés pouvant compenser l'amertume [Breslin, 1996].

Tableau i.5. Exemples de composés responsables de l'amertume chez des plantes alimentaires.

| Famille | Espèce (nom commun) | Partie consommée | Classe des composés | Métabolites impliqués dans l'amertume | Références |
|---------------------|--|------------------|---|---|---|
| Apiaceae | <i>Daucus carota</i> (carotte) | Racine | Polyacétylène Acide phénolique | Falcarindiol (FADOH) Dérivé d'acide di-caféique (DCAD) | Kreutzmann <i>et al.</i> , 2008 |
| Asparagaceae | <i>Asparagus officinalis</i> (asperge blanche) | Pousse | Saponine | Protodioscine, néoprotodioscine, (25R)ASP-II, ASP-II, (25R)-dihydro-ASP-II, (25S)-Dihydro-ASP-II, AS-I, AS-2-I, dioscine | Dawid et Hofmann, 2014 |
| | <i>Artemisia absinthium</i> (herbe d'absinthe) | Feuille, fleur | Lactone sesquiterpénique | Absinthine, anabsinthine, anabsine, artabsine, kétopelenolide b | Yashiro <i>et al.</i> , 2004; Brockhoff <i>et al.</i> , 2007; Lachenmeier, 2007; Aberhamet <i>et al.</i> , 2010; Szopa <i>et al.</i> , 2020 |
| | <i>Artemisia umbelliformis</i> (génépi blanc) | Fleur | Lactone sesquiterpénique | 5-déoxy-5-hydroperoxy-5-épitétékine; 5-déoxy-5-hydroperoxytétékine; umbellifolide; costunolide | Brockhoff <i>et al.</i> , 2007; Rubiolo <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>Cichorium endivia</i> (chicorée scarole, chicorée frisée) | Feuille | Flavonol Lactone sesquiterpénique | Kaempférol malonyl glucoside Lactucine glycoside, lactucopirine glycoside, 8-déoxylactucine, 8-déoxylactucine glycoside, lactucine, lactucopirine | Filippo d'Antuono <i>et al.</i> , 2016 Price <i>et al.</i> , 1990; Filippod'Antuono <i>et al.</i> , 2016 |
| Asteraceae | <i>Cichorium intybus</i> (chicorée industrielle, witloof, chioggia, raddichio, barbe de capucin) | Feuille, racine | Lactone sesquiterpénique | Lactucine, lactucopirine, 8-déoxylactucine, 11(S),13-dihydro-lactucine, 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine | Van Beek <i>et al.</i> , 1990; Pollet <i>et al.</i> , 2002 |
| | <i>Cynara scolymus</i> (artichaut) | Fleur | Lactone sesquiterpénique | Cynaropicrine, déhydrocynaropicrine, grosheimine, cynaratriol | Fritsche <i>et al.</i> , 2002; Cravotto <i>et al.</i> , 2005; Brockhoff <i>et al.</i> , 2007 |
| | <i>Lactuca sativa</i> (laitue) | Feuille | Lactone sesquiterpénique | Lactucine glycoside, lactucopirine glycoside, 8-déoxylactucine, 8-déoxylactucine glycoside, lactucine, lactucopirine, 1.β,13-dihydro-lactucine-8-O-sulfate, cichorioside B, 8-déacétylmatricarine-8-O-sulfate, 8-déoxylactucine-15-sulphate, lactucine-15-oxalate, lactucopirine-15-oxalate | Price <i>et al.</i> , 1990; Seo <i>et al.</i> , 2009; Chadwick <i>et al.</i> , 2016; Mai et Glomb, 2016 |
| | <i>Taraxacum sp</i> (pissenlit) | Feuille | Acide phénolique Lactone sesquiterpénique Phytostérol | Acide p-hydroxyphénylacétique Acide 11,13-dihydro-taraxine 1'-O-β-glucopyranoside, acide taraxinique 1'-O-β-glucopyranoside β-sitostérol | Kuusi et Autio, 1985a; Kuusi <i>et al.</i> , 1985b |

Tableau i.5. Exemples de composés responsables de l'amertume chez des plantes alimentaires (suite).

| Famille | Espèce (nom commun) | Partie consommée | Classe des composés | Métabolites impliqués dans l'amertume | Références |
|-----------------------|--|-----------------------|---------------------------|---|--|
| Brassicaceae | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> (chou kale) | Feuille | Glucosinolate | Gluconapine, glucobrassicine | Zeng <i>et al.</i> , 2021 |
| | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> (chou-fleur) | Bouton floral | Glucosinolate | Néoglucobrassicine, sinigrine, gluconapine, progoitrine, néoglucobrassicine | Engel <i>et al.</i> , 2002; Schonhof <i>et al.</i> , 2004 |
| | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>cymosa</i> ou var. <i>italica</i> (chou broccoli) | Bouton floral | Glucosinolate | Néoglucobrassicine, gluconapine, glucobrassicine, sinigrine, progoitrine | Schonhof <i>et al.</i> , 2004; Zabaraset <i>et al.</i> , 2013, |
| | <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> (choux de bruxelles) | Feuille | Glucosinolate | Progoitrine, sinigrine, glucobrassicine, gluconapine, goitrine, néoglucobrassicine | Fenwick et Griffiths, 1981; Fenwick <i>et al.</i> , 1983; Van Doornet <i>et al.</i> , 1998; Zabaraset <i>et al.</i> , 2013 |
| | <i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i> (navet) | Racine | Glucosinolate | Progoitrine, gluconapine, 4-méthoxyglucobrassicine, glucobrassicine | Francisco <i>et al.</i> , 2009; Noret <i>et al.</i> , 2020 |
| Cannabaceae | <i>Eruca sativa</i> (roquette) | Feuille | Glucosinolate Flavonol | progoitrine, glucosativine Kaempférol-3-(2-sinapoylglucoside)-4'-glucoside | Pasini <i>et al.</i> , 2011 Pasini <i>et al.</i> , 2011; Belle <i>et al.</i> , 2017 |
| | <i>Raphanus sativus</i> (radis) | Racine | Glucosinolate | Déhydroérucine | Choi <i>et al.</i> , 2010 |
| | <i>Humulus lupulus</i> (houblon) | Inflorescence femelle | Acide α | Isocohumulone, isohumulone, isoahumulone | Intelmann <i>et al.</i> , 2009 |
| | <i>Capparis spinosa</i> (câprier) | Bouton floral | Flavonol | Quercétine, Rutine | Francesca <i>et al.</i> , 2016 |
| Chenopodiaceae | <i>Chenopodium quinoa</i> (quinoa) | Graine | Saponine | Quinoside A, quinoside B, quinoside C | Meyer <i>et al.</i> , 1990; Bonfiglio <i>et al.</i> , 2020 |
| | <i>Citrullus colocynthis</i> (coloquinte) | Fruit | Triterpène glycoside | Cucurbitacine B, cucurbitacine D, cucurbitacine E, cucurbitacine I, cucurbitacine K | Davidovich-Rikanati <i>et al.</i> , 2015 |
| Cucurbitaceae | <i>Citrullus lanatus</i> var. <i>citroides</i> (pastèque) | Fruit | Triterpène glycoside | Cucurbitacine B, cucurbitacine D, cucurbitacine E, cucurbitacine I, cucurbitacine K | Matsuo <i>et al.</i> , 1999; Davidovich-Rikanati <i>et al.</i> , 2015 |
| | <i>Cucumis melo</i> (melon) | Fruit | Triterpène glycoside | Cucurbitacine B | Hua <i>et al.</i> , 2019; Luo <i>et al.</i> , 2020 |
| | <i>Cucumis sativus</i> (concombre) | Fruit | Triterpène glycoside | Cucurbitacine C | Horie <i>et al.</i> , 2007; Shang <i>et al.</i> , 2014 |
| | <i>Cucurbitapepo</i> L. (courgette, citrouille, etc) | Fruit | Triterpène glycoside | Cucurbitacine E, cucurbitacine E glycoside | Rymal <i>et al.</i> , 1983; Hutt et Herrington, 1985 |
| | <i>Momordica charantia</i> (melon amer) | Fruit | Saponine | Momordicine I, momordicine II, momordicoside K, momordicoside L | Okabe <i>et al.</i> , 1982; Yasuda <i>et al.</i> , 1984 |

Tableau 1.5. Exemples de composés responsables de l'amertume chez des plantes alimentaires (suite).

| Famille | Espèce (nom commun) | Partie consommée | Classe des composés | Métabolites impliqués dans l'amertume | Références |
|---------------------|--|--------------------------|---|--|---|
| Ericaceae | <i>Empetrum nigrum</i> (camarine noire) | Fruit | Flavonol | Quercétine glycosides inconnus, myricétine-3-O-arabinoside, isorhamnétine-3-O-arabinoside, laricitrine glycoside inconnue, syringétine-3-O-arabinoside, syringétine, isorhamnétine | Laaksonen <i>et al.</i> , 2011 |
| | <i>Vaccinium myrtillus</i> (myrtille) | Fruit | Flavonol | Myricétine-3-O-arabinoside | Laaksonen <i>et al.</i> , 2010 |
| Fabaceae | <i>Glycine max</i> (soja) | Germe, graine | Isoflavone Saponine | Malonyldaidzine malonylglycitrine, malonylgénistine DDMP- α , DDMP- β , DDMP- β g | Aldinet <i>et al.</i> , 2006 |
| | <i>Pisum sativum</i> (pois) | Graine | Saponine | DDMP, saponine B, soyasaponinel | Price et Fenwick, 1984; Hengget <i>et al.</i> , 2006 |
| Juglandaceae | <i>Juglans regia</i> (noyer) | Fruit frais (noix verte) | Napthaquinone Acide phénolique Flavonol | Juglone Acide gallique, acide néochlorogénique Rutine | Uğurlu <i>et al.</i> , 2020 |
| Lythraceae | <i>Punica granatum</i> (grenadier) | Fruit | Composés phénoliques | Non précisé | Fischer <i>et al.</i> , 2011; Vázquez-Araújo <i>et al.</i> , 2011 |
| Oleaceae | <i>Olea europaea</i> (olivier) | Fruit | Tannin | Oleuropéine | Walter <i>et al.</i> , 1973 |
| Pedaliaceae | <i>Sesamum indicum</i> (sésame) | Graine germée | Acide aminé | Arginine | Hou <i>et al.</i> , 2021 |
| Rosaceae | <i>Prunus dulcis</i> (amandier) | Fruit | Glucoside cyanogène | Amygdaline | Sánchez-Pérez <i>et al.</i> , 2008 |
| Rubiaceae | <i>Coffea</i> L. (caféier) | Frain Boisson | Alcaloïde Acide hydroxycinnamique Diterpène glycoside | Caféine, trigonelline Acide chlorogénique Kahwéol | Clifford, 1985; Seninde et Chambers, 2021 |
| | <i>Citrus</i> sp. (citronnier, mandarinier, pamplemoussier...) | Fruit | Triterpène Flavanone | Limonine Naringine | Hasegawa <i>et al.</i> , 1996; Purewal et Sandhu, 2021 |
| Rutaceae | <i>Zanthoxylum bungeanum</i> (poivrier de Chine) | Grain | Coumarine Flavonol | 7-méthoxycoumarine 8-prénylkaempferol, quercétine-3-O-glucoside, quercétine, arbutine, isorhamnétine | Ke <i>et al.</i> , 2021; Yang <i>et al.</i> , 2021 |

Tableau i.5. Exemples de composés responsables de l'amertume chez des plantes alimentaires (suite).

| Famille | Espèce (nom commun) | Partie consommée | Classe des composés | Métabolites impliqués dans l'amertume | Références |
|----------------------|---|------------------|--|--|---|
| Solanaceae | <i>Solanum tuberosum</i> (pomme de terre) | Tubercule | Glyco-alcaloïde | α -solanine, α -chalconine, β 2- chalconine | Zitnak et Filadelfi, 1985 |
| | <i>Solanum lycopersicum</i> (tomate) | Fruit | Glyco-alcaloïde | α -tomatine | Rick <i>et al.</i> , 1994; |
| | <i>Solanum melongena</i> (aubergine) | Fruit | Glyco-alcaloïde | Solasonine | Bagheri <i>et al.</i> , 2017 |
| Sterculiaceae | <i>Capsicum annuum</i> (piment, poivron) | Fruit | Alcaloïde Flavonol | Capsaïcine Quercétine-3-O-rhamnoside | Green et Hayes, 2004; Fukao <i>et al.</i> , 2019 |
| | <i>Theobroma cacao</i> (cacaoyer) | Fève | Alcaloïde Flavan-3-ol Peptide | Théobromine Catéchine, épicatechine Dikétopiperazine | Pickenhagen <i>et al.</i> , 1975; Bonhevi et Coll, 1997 |
| Theaceae | <i>Camellia sinensis</i> (théier) | Feuille | Acide phénolique Flavanol | Acide gallique (+)-catéchine, (+)-gallocatéchine, (-)-catéchine-3-gallate, (-)-gallocatéchine-3-gallate, (-)-épicatechine, (-)-épigallocatéchine-gallate, (-)-épicatechine-3-gallate | Xu <i>et al.</i> , 2018; Chen <i>et al.</i> , 2022 |
| Vitaceae | <i>Vitis vinifera</i> (vigne) | Fruit | Flavonol Flavone Acide hydroxycinnamique | Kaempférol, quercétine-3-O-rutinoside Vitétin-2-O-rhamnoside Éthyl d'ester d'acide férulique, éthyl d'ester d'acide p-coumarique, éthyl d'ester d'acide caféique, éthyl d'ester d'acide syringique | Noble, 1994; Hufnagel et Hofmann, 2008 |
| | | | Acide phénolique Flavanol | Éthyl d'ester d'acide gallique (+)-catéchine, (-)-épicatechine, procyanidineC1 | |

2.3. Présentation des différentes méthodes de désamérisation.

L'amertume étant une saveur retrouvée dans de nombreuses plantes alimentaires, elle représente un intérêt économique selon le désir et le goût des consommateurs. Pour les boissons de type café, bière ou thé, celle-ci est souvent recherchée tandis que pour d'autres aliments, elle constitue un frein à la consommation.

Pour pallier l'aversion que peut provoquer l'amertume, la plus ancienne des méthodes reste la sélection variétale résultant de croisements avec des variétés peu amères comme pour les cas du concombre (*Cucumis sativus*) et l'amande (*Prunus dulcis*). L'étude de populations réalisée par Qi *et al.* [2013] a montré que la domestication du concombre est à l'origine de la diminution de l'amertume suite à de multiples sélections spécifiques de la région comprenant le gène *Bitter Fruit (Bt)*. La domestication de l'amande par sélection variétale a aussi permis d'obtenir des fruits comestibles notamment grâce à la diminution de la fréquence des allèles responsables de la production de l'amygdaline, composé responsable de l'amertume [Dicenta et Garcia, 1993]. Plus récemment, une sélection divergente a été réalisée avec différents génotypes de chou kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), variables dans leur contenu en glucosinolates. Il en a résulté la génération de génotypes contenant moins de glucosinolates, et donc moins amers [Sotelo *et al.*, 2016]. La désamérisation par la sélection variétale présente l'avantage de générer des variétés ou des génotypes dont l'amertume est modulée, et donc de garder les propriétés bénéfiques attachées aux composés responsables de cette saveur. Cependant, cette méthode reste longue puisqu'en fonction de la plante, elle peut prendre plusieurs années. De plus, pour certaines espèces, il n'existe pas de génotypes moins amers déjà présents sur le marché avec lesquels se reproduire ou encore, ces espèces peuvent avoir des facteurs limitant la reproduction.

De nombreuses autres approches ont été mises en place pour réduire l'amertume des plantes ou des produits alimentaires issus des plantes, dont :

- 1) Le retrait des tissus périphériques de la plante, du légume ou du fruit. C'est le cas du radis (*Raphanus sativus* L.) dont les épluchures sont riches en glucosinolates [Carlson *et al.*, 1985] ou encore des tubercules de pomme de terre dont les parties vertes sont riches en glycoalcaloïdes [Uluwaduge, 2018]. Cette méthode présente l'avantage de considérablement diminuer l'amertume lorsque les molécules qui en sont responsables sont situées dans la partie externe de la plante, du légume ou du fruit. Néanmoins, cette solution n'est pas adaptable à toutes les plantes et notamment lorsque ce sont les feuilles qui sont consommées. De plus, il est traditionnellement admis qu'une majorité des nutriments sont concentrés dans la peau ou la partie externe des aliments, aussi cette méthode

provoque une perte des propriétés nutritionnelles ainsi que des bienfaits des aliments. Cela a notamment été montré pour le quinoa (*Chenopodium quinoa*), où une analyse d'une méthode de retrait du péricarpe de la graine a entraîné une réduction de 70% de l'amertume du quinoa, mais surtout une diminution des composés phénoliques qui sont responsables des effets bénéfiques pour la santé [Gómez-Caravaca *et al.*, 2014].

2) L'immersion des aliments pendant plusieurs heures dans de l'eau froide ou bouillante permet de retirer une quantité non négligeable de molécules amères. Cette méthode est facile à mettre en place et a déjà montré son efficacité pour de nombreuses espèces telles que la chicorée [Kops et Gevers Deijnoot, 1853, Twarogowska *et al.*, 2020], le quinoa [Quispe-Fuentes *et al.*, 2013] ou encore la moutarde [Sindhu *et al.*, 2012], mais encore une fois, elle ne peut être adaptée à tous les végétaux puisque les composés amers ne sont pas toujours solubles ou stockés dans les tissus externes.

3) La fermentation ou la germination peuvent permettre de modifier les saveurs et parfois, de réduire l'amertume comme cela a pu être démontré pour le thé noir [Chen *et al.*, 2021] ou pour le chocolat dont la fermentation a réduit de 6 à 17% la quantité de polyphénols [Nazaruddin *et al.*, 2006]. Cette méthode, au même titre que celles présentées ci-dessus, reste limitée à certaines plantes alimentaires et peut résulter en un changement drastique du produit et de sa façon de le consommer.

4) L'ajout de composés permettant de masquer ou de compenser l'amertume d'un produit transformé à partir d'une plante. Cela peut être réalisé en jouant sur les saveurs, avec l'ajout de sucre, de sels ou encore d'acidité pour dominer le goût amer [Breslin, 1996] mais ceci contribue aussi à modifier les propriétés nutritives de l'aliment et peut, dans certains cas, entraîner des effets indésirables sur la santé. Il est aussi possible d'ajouter des bloqueurs de l'amertume dans la composition d'un produit tel que la β -cyclodextrine, ou le sel de sodium de l'homoériodictyol couplé à des sucres [Gaudette et Pickering, 2012], ou des inhibiteurs des récepteurs TAS2R [Slack *et al.*, 2010 ; Greene *et al.*, 2011 ; Roland *et al.*, 2014], mais cela reste une solution au cas par cas. Les bloqueurs sont souvent spécifiques d'un composé donné tout comme les inhibiteurs de récepteurs sont souvent spécifiques d'un récepteur TAS2R. D'autres méthodes visant à modifier la diffusion des composés amers ont été élaborées : l'ajout de composés lipidiques ou d'huiles qui agissent comme surfactant ou emprisonnent les molécules amères [Fujita et Kuroki, 2004], ou l'ajout de carbohydrates qui, en réaction à la salive, vont créer un gel diminuant la vitesse de diffusion des molécules amères [Sun-Waterhouse *et al.*, 2013]. Ces méthodes présentent l'inconvénient de provoquer un changement des propriétés physico-chimiques des produits alimentaires avec notamment une augmentation de la viscosité.

5) Les approches d'ingénierie génétique permettant de moduler la production de molécules, de manière rapide et souvent à moindre coût. La mise en place de ces méthodes nécessite soit

l'identification de gènes induisant une forte modification des saveurs, soit l'identification des voies de biosynthèse des molécules responsables de l'amertume. Dans le premier cas, on peut noter des travaux de transgénèse utilisant principalement *Agrobacterium tumefaciens* pour introduire des gènes produisant des protéines au goût sucré telles que la thaumatococine chez la pomme de terre [Witty, 1990], le concombre [Szwacka *et al.*, 2002], la tomate [Bartoszewski *et al.*, 2003], la miraculine chez la laitue [Sun *et al.*, 2006], ou la monelline chez la tomate [Reddy *et al.*, 2015]. Dans le second cas, il existe encore peu de travaux parlant de la régulation ou l'édition des gènes impliqués dans la synthèse des molécules amères. Pour le moment, on peut noter les travaux réalisés chez *Brassica juncea* dans lesquels le RNAi a permis de moduler la production de glucosinolates [Augustine et Bisht, 2019], ou encore l'utilisation de CRISPR/Cas9 chez *Solanum tuberosum* pour générer des lignées ne produisant plus de α -solanine [Nakayasu, 2018] ou chez *Cichorium intybus* pour diminuer la production de STLs [Cankar *et al.*, 2021 ; Cankar *et al.*, 2022]. Bien que ces méthodes permettent de générer rapidement des plantes, celle-ci sont considérées comme des organismes génétiquement modifiés (OGM) et leur culture reste impossible dans de nombreux pays, notamment en Europe.

3. L'édition du génome chez les plantes.

Depuis plusieurs années déjà, les travaux sur la transformation génétique des végétaux se sont développés avec pour but d'élucider la fonction des gènes, d'améliorer les systèmes végétaux, de moduler la production de molécules d'intérêt, ou même de créer de nouvelles variétés. Les premières publications sur les plantes transgéniques datent des années 1980 [Herrera-Estrella *et al.*, 1983] et les premières cultures de plantes transgéniques sont apparues, dès 1994, aux Etats-Unis [Herrera-Estrella *et al.*, 2004]. Cependant, en France et plus globalement en Europe, la culture de plantes OGM reste encore très limitée et très réglementée. En France, la législation est très stricte puisqu'aucune culture OGM à des fins commerciales n'est autorisée. Une centaine d'OGM ou de produits dérivés sont toutefois autorisés à la vente pour l'alimentation humaine et animale sur le territoire [Ministère de la Transition écologique et de la Cohésion des territoires, France].

3.1. Edition du génome.

Initialement la transgénèse permettait de faire de la génétique inverse, c'est-à-dire, de partir d'un gène dont on veut déterminer la fonction et de le surexprimer ou de l'exprimer de manière ectopique. Depuis une dizaine d'années, la recherche s'est tournée vers l'édition génomique consistant à modifier un gène en l'inactivant, en introduisant un autre gène ou une mutation spécifique voire en corrigeant une mutation afin d'observer le phénotype induit via l'utilisation de nucléases

(enzyme clivant les chaînes d'acides nucléiques). On peut compter 3 techniques spécifiques : les nucléases en doigts de zincs, les nucléases effectrices de type activateur de transcription (ou TALEN) et les systèmes Cluster Regularly Interspace Short Palindromic Repeats (CRISPR)–associated (CAS). Ces systèmes permettent de cibler spécifiquement un endroit du génome afin d'y induire une cassure double brin. Ces cassures peuvent ensuite être réparées de deux façons différentes : par recombinaison homologue en présence d'un ADN homologue ou donneur, ou par jonction d'extrémités non-homologues (**Figure i.6**). La recombinaison homologue est une réparation conservatrice permettant la correction d'un gène ou le remplacement de celui-ci dans le cas de l'insertion d'un ADN exogène. La jonction d'extrémités non-homologues est une réparation non conservatrice créant des insertions ou des délétions de quelques nucléotides dans un locus spécifique, pouvant mener à un knock-out [Arshid Shabir, 2021].

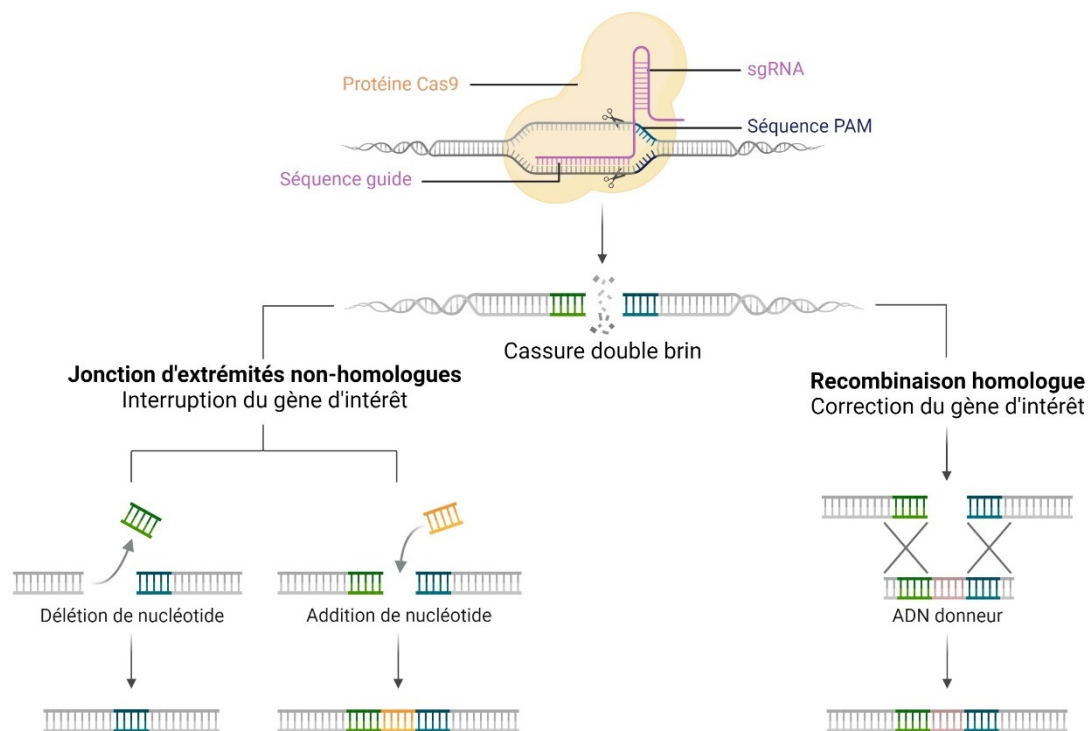


Figure i.6. Exemple de réparations induites à la suite d'une cassure double-brin.

3.2. Historique de CRISPR/Cas.

Le système CRISPR/Cas a été découvert chez les archées et les bactéries, où il est naturellement présent en tant que système immunitaire adaptatif [Jansen *et al.*, 2002 ; Lander, 2016]. Chez les procaryotes, ce système a pour but de dégrader des gènes exogènes ou des plasmides provenant de phages et d'empêcher la mort de l'organisme. Ce système a premièrement été mis en évidence, en 1987, chez *Escherichia coli* par la découverte de séquences répétées de 29 nucléotides,

espacées de 5 séquences non-répétitives de 32 nucléotides (= spacer) [Ishino *et al.*, 1987], mais ce n'est qu'en 2005, que le rôle d'immunité adaptative bactérienne a été suggéré [Bolotin *et al.*, 2005 ; Mojica *et al.*, 2005]. En effet, c'est à ce moment que les chercheurs ont trouvé que les séquences « spacers » étaient homologues aux séquences virales et plasmidiques de certains procaryotes capables d'infecter les bactéries. Il faudra attendre 2007 pour que des travaux prouvent le rôle de CRISPR dans l'immunité adaptative bactérienne [Barrangou *et al.*, 2007]. Le mécanisme d'action de CRISPR a été élucidé en 2010 par Garneau *et al.*, et la reconstitution *in vitro* du système CRISPR a permis de comprendre les éléments clés indispensables à son fonctionnement [Sapranuskas *et al.*, 2011].

3.3. Mécanisme d'action du CRISPR.

Actuellement, le système CRISPR/Cas est catégorisé en 2 classes, 6 types et plus d'une trentaine de sous-types. Les systèmes CRISPR/Cas de classe 1 sont majoritairement retrouvés dans les archées tandis que les systèmes CRISPR/Cas de classe 2 sont retrouvés chez les bactéries et sont plus adaptés pour la recherche et l'ingénierie génétique [Koonin *et al.*, 2017 ; Tang et Fu, 2018]. Le système CRISPR/Cas de classe 2 inclut : le sous-type II, caractérisé par la nucléase Cas9, le sous-type V, caractérisé par les nucléases Cas12, et le sous-type VI, caractérisé par les nucléases Cas13 [Koonin *et al.*, 2017 ; Tang et Fu, 2018]. Le système CRISPR/Cas de type II est, pour le moment, celui dont la compréhension est la plus avancée et pour lequel de nombreuses méthodes d'application ont été développées. Dans la nature, ce système requiert 3 éléments : un crRNA (CRISPR RNA) de 20 nucléotides qui contient la séquence identique à la séquence ciblée et joue le rôle de guide, une protéine Cas9 possédant des domaines nucléases HNH et RuvC capables de cliver les deux brins de l'ADN, et un tracrRNA (trans-activating crRNA) de 80 nucléotides qui permet de mettre en interaction le crRNA avec la protéine Cas9 [Jinek *et al.*, 2012 ; Gasiunas *et al.*, 2012]. Les avancées dans la biologie moléculaire ont permis de fusionner le crRNA et le tracrRNA en un simple guide (sgRNA) chimérique, permettant la simplification du système CRISPR/Cas. Ainsi, seuls un ou des sgRNAs et une endonucléase Cas9, sont nécessaires pour constituer le complexe moléculaire qu'est CRISPR/Cas9 [Jinek *et al.*, 2012] (**Figure i.6**). La liaison à l'ADN du complexe Cas9-sgRNA nécessite la reconnaissance d'un motif PAM (protospacer-adjacent motif) sur le gène cible. Ce motif est retrouvé en aval (en 3') de la séquence cible et correspond généralement à une séquence 5'-NGG-3' (N désignant n'importe quel nucléotide) mais cela peut varier selon le type de Cas utilisée [Jinek *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2020]. Lorsque le sgRNA est parfaitement complémentaire à la séquence du gène, la protéine Cas9 induit une cassure double brin au niveau du 3^{ème} nucléotide en amont du motif PAM (**Figure i.6**).

Même si CRISPR/Cas9 est considéré comme un système d'édition du génome précis, parfois des hybridations aspécifiques du sgRNA peuvent avoir lieu et donner naissance à des mutations hors-cible appelées mutations off-target. Les mutations off-target correspondent à des clivages non-spécifiques de gènes pouvant provoquer des mutations non attendues. Pour minimiser l'apparition des mutations off-target, de nombreux outils tels que CRISPOR (crispor.tefor.net) [Haeusslet *et al.*, 2016] sont disponibles en ligne, et permettent le design de sgRNA ainsi que la prédiction de mutations off-target potentielles. Néanmoins, bien que ces outils soient utiles pour débiter une recherche de séquences cibles, il est nécessaire de prendre en compte la séquence du sgRNA pour minimiser le nombre de mutations off-target. En effet, il faut savoir que l'on considère le sgRNA comme divisé en 2 parties : une séquence « seed » de 10-12 nucléotides au niveau de l'extrémité 3' (proche du motif PAM), relativement intolérante aux mismatches (ou mésappariements), et une séquence « non-seed » de 8-10 nucléotides vers l'extrémité 5' plutôt tolérante envers les mésappariements (**Figure i.7**). La présence de mésappariements dans la séquence « seed » tend à réduire l'activité de clivage de la Cas9 tandis que la présence de mésappariements dans la séquence « non-seed » n'affecte pas l'activité de la protéine Cas9 mais pourrait être à l'origine d'hybridations aspécifiques [Jinek *et al.*, 2012 ; Miano *et al.*, 2016].

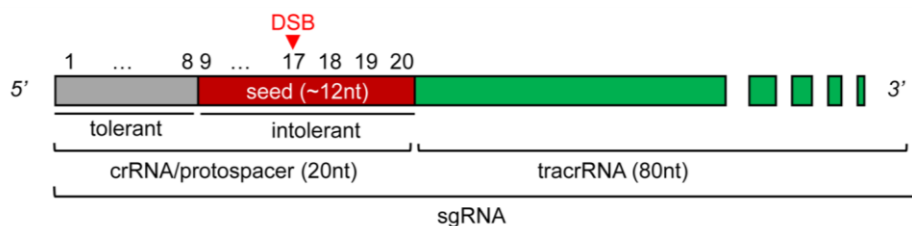


Figure i.7. Représentation d'un sgRNA [Miano *et al.*, 2016]. Le crRNA contient les 20 nucléotides spécifiques de la séquence ciblée dont la séquence « seed » intolérante aux mésappariements (rouge) et la séquence « non-seed » tolérante aux mésappariements (grise). DSB : lieu de la cassure double brin.

4. Contexte et objectifs de la thèse

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le projet « Amertume » de l'équipe mixte Chic41H (Chicory for One Health) associant des chercheurs de l'entreprise Florimond-Desprez et de l'Institut Charles Viollette. Plusieurs axes de recherche sont associés à ce projet tels que l'analyse de la variabilité des gènes et facteurs de transcription impliqués dans l'amertume de la chicorée, la caractérisation des différentes STLs, la recherche de variants naturellement moins amers et l'édition par CRISPR/Cas9 des gènes impliqués dans la synthèse des STLs. Ces multiples axes ont pour but de mieux comprendre les différentes étapes de la voie de biosynthèse conduisant à la production des STLs, afin de permettre, à terme, de créer des nouvelles variétés de chicorée industrielle dont l'amertume aura été diminuée, voire des variétés dont l'amertume aura été augmentée (dans le cas

d'une augmentation de l'activité antiparasitaire pour l'alimentation animale, par exemple). L'obtention de chicorées moins amères pourrait être réalisée par des approches de sélection variétale classique, toutefois cela nécessite une sélection longue et fastidieuse, en plus de procéder aux tests gustatifs de nombreuses plantes, ce qui semble irréalisable. L'idée de réaliser de la mutagenèse dirigée via le système CRISPR/Cas9 permettrait un gain de temps considérable puisqu'il serait alors possible de confirmer les gènes indispensables pour l'expression du trait « amertume ». En disposant de chicorées moins amères, le développement d'ingrédients fonctionnels utilisables dans le domaine de l'agro-alimentaire ou la santé pourra être développé. En effet, la chicorée industrielle possède de nombreux effets sur la santé comme cela a été évoqué à de multiples reprises dans cette introduction mais son utilisation en agroalimentaire reste encore limitée à l'heure actuelle. Différentes études, présentées dans cette introduction, ont cherché à incorporer des extraits de chicorée sous forme de poudre ou de farine dans différents produits alimentaires. Ces alternatives aux produits « traditionnels » ont été réalisées dans le but d'améliorer la texture, la cuisson ou encore la qualité nutritionnelle de ceux-ci. Cependant cette incorporation de sous-produits de chicorée reste limitée à la suite de la perception d'un goût amer souvent peu apprécié des consommateurs.

Ma thèse, focalisée sur le lien entre l'amertume de la chicorée industrielle et les gènes de la voie de biosynthèse des STLs, contribue à ce projet. Elle a pour objectif de moduler l'amertume de la chicorée industrielle par des moyens d'ingénierie génétique tels que CRISPR/Cas9. Cette finalité ne peut être obtenue qu'en passant par l'identification et la caractérisation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs, la vérification du lien de causalité entre les gènes et la production des STLs, et enfin l'application sur du matériel d'intérêt agronomique. Au cours de ma thèse, mes travaux ont porté sur des chicorées d'intérêt agronomique différent :

- D'un côté, la chicorée ChicBitter002 dont l'entreprise Florimond-Desprez possède un génome séquencé et partiellement annoté. Cette chicorée ChicBitter002 est un clone maintenu *in vitro* au sein du laboratoire et qui présente un intérêt pour la recherche expérimentale. En effet, il peut facilement être multiplié *in vitro*, présente la particularité de s'autoféconder ce qui constitue une caractéristique particulière au sein des chicorées industrielles, et toutes les plantes issues de ce clone présentent le même fond génétique même si des variations somaclonales due à la micropropagation peuvent survenir. De plus, de précédents travaux de transformation génétique sur le clone ChicBitter002 ont permis de montrer sa compatibilité avec la transformation médiée par *Rhizobium rhizogenes* [Bernard *et al.*, 2019]. Grâce à toutes ces caractéristiques, la chicorée ChicBitter002 a été utilisée pour caractériser les séquences de nos gènes d'intérêt (**Chapitre 1**) et les éditer par CRISPR/Cas9 via une transformation stable médiée par *R. rhizogenes* (**Chapitre 2**) afin d'établir la preuve de concept démontrant que la mutation des gènes de la voie de biosynthèse

des STLs mène bien à une réduction de la production de ces molécules, et donc à une diminution de l'amertume de la chicorée.

- D'un autre côté, des composantes de variétés de chicorée utilisées pour la création de 2 variétés cultivées. Afin de fournir du matériel plus adapté pour les sélectionneurs mais aussi de montrer qu'il est possible de transférer notre méthode d'édition par CRISPR/Cas9 à d'autres génotypes de chicorée, 5 composantes de chicorée nommées ChicBitter003, ChicBitter004, ChicBitter005, ChicBitter006 et ChicBitter007 ont aussi été utilisées. Ces composantes de chicorée sont des populations de plantes partageant un ou plusieurs caractères agronomiques d'intérêt pour les sélectionneurs et ont un pool de gènes communs. En général, une variété est composée d'un mélange de 3 composantes. La finalité est donc de rendre une ou deux composantes d'une variété moins amères afin d'introduire, par inter-croisements, des gènes mutés dans les variétés de chicorée et de les fixer. L'application de l'édition par CRISPR/Cas9 des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs a été réalisée via une transformation transitoire des protoplastes de ces différentes composantes après plusieurs étapes d'optimisation et fera l'objet du **Chapitre 3**.

CHAPITRE 1 : Caractérisation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs.

1. Introduction.

Afin de mieux comprendre la voie de biosynthèse des lactones sesquiterpéniques et d'éditer le génome de la chicorée industrielle en vue de moduler l'amertume, il est nécessaire d'en identifier les gènes clés. Les premiers travaux sur les lactones sesquiterpéniques (STLs) de la chicorée remontent au 19^{ème} siècle. En effet, la lactucine et la lactucopicine ont été décrites pour la première fois par Buchner en 1833 et par Ludwig et Kromayer en 1862 [mentionnés par Schenck & Graf, 1936]. Le premier isolement de ces deux molécules a été réalisé par Holzer et Zinke en 1953, à partir de latex de racine de *C. intybus* L. Par la suite, d'autres STLs de la classe des guaianolides ont été identifiées chez la chicorée, parmi lesquelles on retrouve la 8-déoxylactucine [Pyrek, 1985 ; Seto *et al.*, 1988], les dérivés 11(S),13-dihydro-lactucine, 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine et 11(S),13-dihydro-lactucopicine [Van Beek *et al.*, 1990] ainsi que leurs dérivés glycosylés ou oxalatés [Seto *et al.*, 1988 ; Sessa *et al.*, 2000 ; Kisiel et Zielińska, 2001]. En parallèle de la caractérisation de ces STLs, l'identification des enzymes responsables de leur synthèse a été réalisée, entre 1998 et 2002, par l'équipe de Kraker *et al.* (**Figure 1.1**). Dans un premier temps en 1998, l'enzyme germacrène A synthase (GAS), permettant de convertir le FPP en germacrène A, a été identifiée. En 2001, les études autour de la voie de biosynthèse de la chicorée ont permis de découvrir et caractériser l'enzyme germacrène A oxydase (GAO), servant de catalyseur à la réaction d'hydroxylation de la germacrène A en l'acide germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-oïque. Enfin en 2002, la (+)-costunolide synthase (COS), qui convertit l'acide germacra-1(10),4,11(13)-trien-12-oïque en (+)-costunolide, a été mise en évidence (**Figure 1.1**). En 2018, une étude menée par Liu *et al.* sur *Tanacetum parthenium* a permis de démontrer que la kauniolide, une lactone sesquiterpénique de type guaianolide, peut être synthétisée à partir du costunolide par une kauniolide synthase (KLS). Cela a été récemment confirmé chez *C. intybus*, en 2022, par l'équipe de Cankar *et al.* (**Figure 1.1**).

Si l'élucidation du début de cette voie de biosynthèse a été rapide, plusieurs années ont été nécessaires pour déterminer les gènes impliqués. C'est ainsi que dès 2002, Bouwmeester *et al.* se sont intéressés à la GAS et ont démontré l'existence de 2 ADNc codant cette enzyme : un ADNc court de 1674 paires de bases (pb) codant pour une protéine de 558 acides aminés et un ADNc long de 1749 pb codant pour une protéine de 583 acides aminés. L'analyse de ces deux ADNc a permis de déterminer qu'ils partagent 72% d'identité au niveau de leur séquence protéique et que les protéines produites exercent la même fonction : celle de convertir le FPP en germacrène A. Cette découverte implique donc l'existence d'au moins 2 gènes de la famille des sesquiterpène synthases codant pour la GAS. Par la suite, des travaux réalisés en 2010 ont démontré que la GAO, une enzyme de la sous-famille des

CYP71 appartenant aux cytochromes P450, était codée par un seul gène du même nom [Nguyen *et al.*, 2010]. Toutefois, il a été démontré *in vitro* que d'autres gènes codant pour des CYP71, tels que la valencène oxydase, permettent la conversion de la germacrène A en son acide [Cankar *et al.*, 2011]. Il semblerait que les membres de la famille des CYP71 possèdent des motifs très conservés permettant de pallier l'action d'autres gènes CYP71AV *in vitro* [Eljounaidi *et al.*, 2014]. Enfin, en 2011, Liu *et al.* ont démontré que l'enzyme COS, elle aussi de la famille des cytochromes P450, était codée par un seul gène.

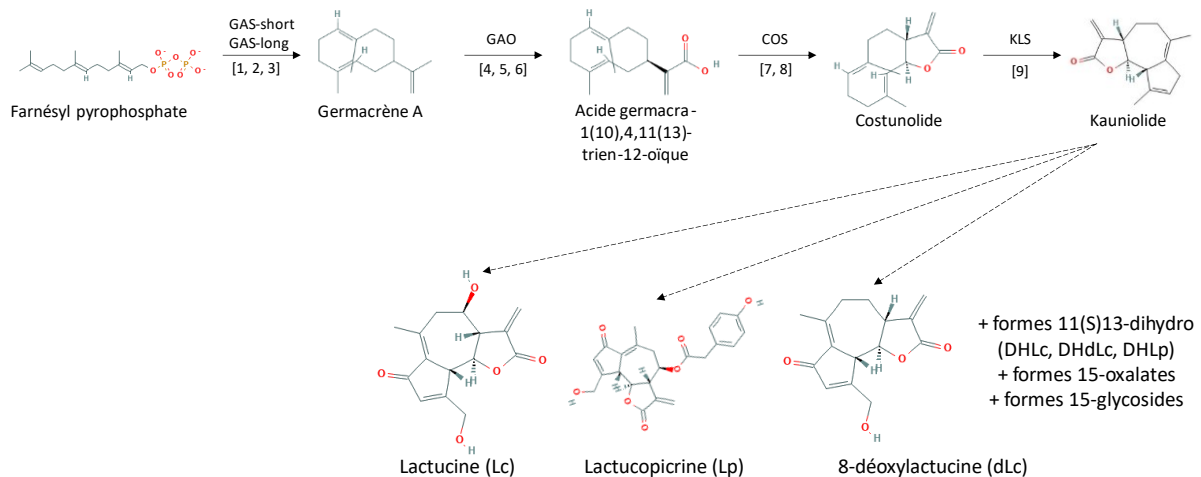


Figure 1.1. Voie de biosynthèse des guaianolides impliqués dans l'amertume de la chicorée. GAS : germacrène A synthase ; GAO : germacrène A oxydase ; COS : costunolide synthase ; KLS : kauniolide synthase. [1 : de Kraker *et al.*, 1998 ; 2 : Bouwmeester *et al.*, 2002 ; 3 : Bogdanovic *et al.*, 2019 ; 4 : de Kraker *et al.*, 2001 ; 5 : Nguyen *et al.*, 2010 ; 6 : Cankar *et al.*, 2011 ; 7 : de Kraker *et al.*, 2002 ; 8 : Liu *et al.*, 2011 ; 9 : Cankar *et al.*, 2022]

Il a fallu plusieurs années pour que les travaux sur la caractérisation des gènes de la voie de biosynthèse des STLs reprennent. Ainsi, en 2019, Bogdanović *et al.* ont publié une nouvelle analyse des gènes codant la GAS et ont constaté que son expression génique était complexe. En effet, grâce au criblage d'une banque BAC construite à partir de deux génotypes différents de chicorée [Gonthier *et al.*, 2010], il a été démontré que la forme longue de la GAS (*GAS-L*) était codée et exprimée par un seul gène, situé sur le locus du groupe de liaison 9 du génome de la chicorée [Bogdanović *et al.*, 2019a], tandis que la forme courte de la GAS (*GAS-S*) était codée par cinq copies géniques situées sur le locus du groupe de liaison 3 du génome de la chicorée [Bogdanović *et al.*, 2019a] (**Figure 1.2**). Néanmoins, l'expression de la *GAS-S* ne dépendrait que de 3 copies : *GAS-S1* à *GAS-S3*. Les deux dernières copies *GAS-S4a* et *GAS-S4b* seraient des allèles d'un même pseudogène et ne permettraient pas de former de protéines fonctionnelles. En effet, la copie *GAS-S4a* disposerait d'un codon stop prématuré dans son 1^{er} exon et la copie *GAS-S4b* posséderait une insertion de 4862 paires de base (pb) au niveau de son 3^{ème} exon, correspondant à un rétrotransposon (**Figure 1.2**). Enfin, en 2022, Cankar *et al.*, ont publié l'identification d'un cluster de 3 copies géniques codant pour la kauniolide synthase.

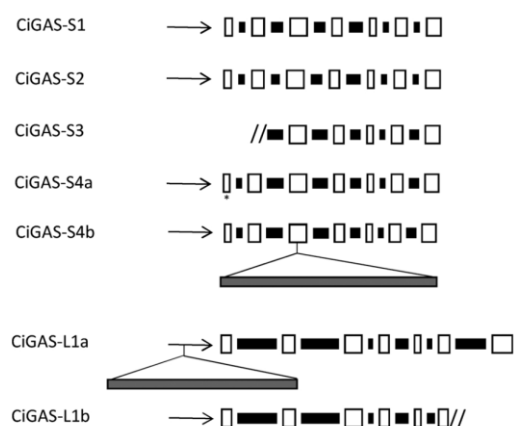


Figure 1.2. Représentation schématique de la structure génomique des gènes GAS [Bogdanović et al., 2019a]. Case blanche : exon ; Case noire : intron ; Case grise : rétrotransposon ; Flèche : promoteur ; // : fin du BAC ; astérisque : codon stop.

Afin de caractériser les gènes clés impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs et d'éditer le génome de la chicorée industrielle dans l'objectif de moduler la production de ces molécules, l'identification structurale des gènes de cette voie a d'abord été réalisée dans le génome partiellement annoté de la chicorée witloof dont dispose l'entreprise Florimond-Desprez. Par la suite, ces structures ont été alignées sur le génome de la chicorée industrielle ChicBitter002 afin d'obtenir les séquences nucléotidiques des gènes *GAS*, *GAO* et *COS* dont l'étude constituera la première partie de ce chapitre. La définition de séquences cibles pour l'édition par CRISPR/Cas9, à partir de la séquence des gènes identifiés dans le génome de la chicorée ChicBitter002 fera, dans son cas, l'objet d'une seconde partie de ce chapitre. Enfin, dans une troisième partie, il sera question de l'analyse de la variabilité génétique de 5 composantes de variétés de chicorée (ChicBitter003 à ChicBitter007). Les composantes étudiées ont pour vocation de générer 2 nouvelles variétés de chicorée et seront éditées par CRISPR/Cas9. Cette analyse a permis de calculer la variabilité génétique inter-composantes au niveau des gènes *GAS*, *GAO* et *COS*, mais aussi d'estimer si de nouvelles cibles pour l'édition par CRISPR/Cas9 devaient être définies dans ces composantes.

Ce premier chapitre se divise donc en 3 grandes parties : l'identification des gènes de la voie de biosynthèse des STLs dans le génome de chicorée industrielle, la définition de séquences cibles dans les gènes *GAS*, *GAO*, et *COS* de la chicorée ChicBitter002, et l'étude de la variabilité de ces gènes et la vérification des séquences cibles définies dans les composantes de variétés de chicorée ChicBitter003 à ChicBitter007.

2. Matériel et Méthodes.

2.1. Matériel végétal.

Des graines de chicorées appartenant à 5 composantes de variétés de chicorée (ChicBitter003, ChicBitter004, ChicBitter005, ChicBitter006, ChicBitter007), fournies par l'entreprise Florimond-Desprez, ont été semées en serre (cycles de 16h de jour et 8h de nuit). Pour chacune des composantes, un lot de 15 plantes a été cultivé. La récolte des feuilles et des racines a été réalisée après 3 mois de culture pour analyser la variabilité génétique et phytochimique des 5 composantes cibles.

2.2. Matériel génétique.

Les génomes séquencés de la chicorée witloof (programme CARGESE, non publié) et de la chicorée industrielle ChicBitter002 (données non publiées, Florimond-Desprez SA, France) ont été utilisés pour les analyses bio-informatiques et l'identification des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs.

2.3. Identification des gènes *GAS*, *GAO* et *COS*.

Les différents gènes candidats *GAS*, *GAO*, et *COS* ont été identifiés dans les séquences des génomes des chicorées witloof et ChicBitter002 à l'aide de l'outil Blastp dont le seuil d'identité était fixé à 85%. Les séquences des gènes *GAS-S* [Uniprot : Q8LSC2] et *GAS-L* [Uniprot : Q8LSC3] de Bouwmeester *et al.* [2002], du gène *GAO* [Uniprot : D5JBW8] de Nguyen *et al.* [2010], et du gène *COS* [Uniprot : G3GBK0] de Liu *et al.* [2011] ont été utilisées comme requêtes (query). L'analyse des gènes a pu être réalisée par l'interrogation de deux bases de données (subject) composée de : 26 367 prédictions *ab initio* de gènes issus des séquences de Chicbitter002 (base de données non publiée, Florimond-Desprez SA, Cappelle-en-Pévèle, France) et 31 631 prédictions *ab initio* de gènes issus du génome de la chicorée witloof ou de leurs séquences génomiques complètes (base de données non publiée, programme CARGESE). Les hits significatifs ont été alignés sur les séquences de ChicBitter002 par l'outil GMAP, et comparés à des banques protéiques de plusieurs espèces végétales telles que *Artemisia annua* [Shen *et al.*, 2018], *Cynara cardunculus* var. *scolymus* [Scaglione *et al.*, 2016], *Lactuca sativa* [Reyes-chin-Wo *et al.*, 2017], *Arabidopsis thaliana* [Cheng *et al.*, 2017], ou encore *Theobroma cacao* [Argout *et al.*, 2011], et à des séquences transcrites de chicorées witloof et industrielle issues d'un RNA-seq (données non publiées, programme CARGESE et Florimond-Desprez SA, Cappelle-en-Pévèle, France). Les gènes candidats pour *GAS* et *GAO* ont été également comparés aux banques BAC publiées par Bogdanović *et al.* [2019a] avec l'outil tBlastn. Enfin, les gènes *GAS-S* identifiés ont été comparés au génome de *C. intybus* Puna [Fan *et al.*, 2022] via l'outil Blastp. Des alignements multiples

de séquences protéiques ont été réalisés via l'outil MAFFT et ClustalOmega pour générer des arbres phylogénétiques et des matrices d'identité nucléotidique [Kato *et al.*, 2019 ; Madeira *et al.*, 2022].

2.4. Définition des séquences cibles dans les gènes *GAS*, *GAO*, et *COS* :

Les séquences cibles ont été définies par le logiciel CRISPOR (crispor.tefor.net) en se basant sur leur contenu en GC et leur score de Doench [Haeussler *et al.*, 2016]. Deux séquences cibles ont été définies pour chacun des gènes suivants : *GAO*, *GAS-L* et *GAS-S*, sauf pour la copie *GAS-S5* où une seule séquence cible a pu être identifiée. Les potentiels sites off-target associés aux séquences cibles ont été obtenus via l'outil Cas-OFFINDER [Bae *et al.*, 2014] et vérifiés manuellement sur les séquences du génome de ChicBitter002 (données non publiées, Florimond-Desprez SA, Cappelle-en-Pévèle, France). La synthèse des sgRNAs correspondant aux séquences ciblées a été réalisée par l'entreprise Sigma-Aldrich (Gilligan, UK) et leurs séquences peuvent être retrouvées dans la **Figure 1.7**.

2.5. Préparation des pools d'ADN génomique.

L'ADN génomique de jeunes feuilles de chicorée (12 plantes par composante) a été extrait via le kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole du fabricant. L'intégrité des ADNs extraits a été vérifiée sur un gel d'agarose 1% (migration 45 min à 90 V). La quantification des ADNs extraits a été réalisée par fluorométrie à l'aide du kit fourni par le fabricant (Quantus Fluorometer, Promega BioSystems, France). Dans le cas où les concentrations obtenues étaient trop élevées, une dilution a été réalisée afin d'obtenir une concentration comprise entre 2 et 10 ng/μL. Des pools d'ADN pour chaque composante ont ensuite été réalisés par le mélange de 10 ng d'ADN des 12 plantes appartenant à la même composante, permettant l'obtention de 5 pools d'ADN.

2.6. Préparation des librairies d'ADN génomique.

Les 5 pools d'ADN ont été préparés selon le kit et le protocole « Celero EZ DNA-Seq library preparation workflowPCR » fourni par NuGEN (TECAN, Männedorf, Suisse) afin de permettre l'obtention de 5 librairies de fragments d'ADN, chacune correspondant à une composante de chicorée. Brièvement, les ADNs ont été fragmentés puis liés à des adaptateurs spécifiques à chaque composante. Les 5 librairies d'ADN ont ensuite été poolées afin d'obtenir un « méga-pool » à séquencer. La qualité et la concentration des 5 librairies d'ADN ainsi que du « méga-pool » ont été vérifiées à l'aide d'une puce à ADN High Sensivity (Agilent Technologies Inc., Californie, Etats-Unis).

2.7. Acquisition et traitement des données de séquençage.

Le séquençage des données a été réalisé au laboratoire de l'Institut du Cerveau (ICM) à la Pitié-Salpêtrière à Paris par la technologie Illumina® (NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit 300 cycles). Le nettoyage et le traitement des données de séquençage ont été réalisés par le laboratoire de biométrie et génétique de Florimond-Desprez. Brièvement, la qualité de séquençage a été vérifiée par l'outil FastQC (bioinformatics.babraham.ac.uk) (couverture de séquençage, qualité des reads, taux de duplication, % de GC, % d'erreur de séquençage) et les adaptateurs ont été éliminés par l'outil Trimmomatic [Bolger *et al.*, 2014]. Les reads restants ont été alignés sur le génome de référence de la chicorée dont dispose l'entreprise Florimond-Desprez avec l'outil BWA-MEM [Li, 2013] et les informations d'alignement ont été stockées sous forme de fichier BAM. L'identification des variants alléliques a ensuite été effectuée via le pipeline GATK [Poplin *et al.*, 2017] en utilisant les fichiers BAM correspondant aux composantes de chicorée et à ChicBitter002. Les fichiers de sortie obtenus ont été analysés de sorte à ne prendre en compte que les régions exoniques de nos gènes d'intérêt. Le pourcentage de variabilité allélique pour chaque gène est calculé par la division du nombre total de nucléotides variants détectés sur la taille (en nucléotide) de l'ADNc du gène correspondant. Le pourcentage de variabilité allélique de l'ensemble des gènes *GAS* est calculé par la somme des pourcentages de variation allélique de chaque gène d'une composante divisée par le nombre de gènes *GAS*. Le pourcentage de variabilité allélique de l'ensemble des gènes *COS* est calculé par la somme des pourcentages de variabilité allélique de chaque gène d'une composante divisée par le nombre de copies du gène *COS*.

2.8. Détermination du contenu en STLs dans les chicorées.

Les racines de 6 plantes par composante ont été prélevées après 3 mois de culture, congelées dans de l'azote liquide, lyophilisées puis broyées. Cinquante mg de poudre de racine ont été extraits avec 1 mL d'eau ultra pure avec de 1% d'acide orthophosphorique sous agitation (900 rpm) à 45°C pendant 60 min. Les surnageants ont été récupérés après centrifugation (10 min, 4°C, 14 000 g), filtrés à travers une plaque de filtration 0,45 µm (AcroPep Advance, 350 µL, membrane Supor 0,45 µm, Pall) puis 100 µL ont été utilisés pour l'analyse par HPLC. Le contenu en STLs a été déterminé par un système HPLC-DAD Prominence (Shimadzu) comprenant une pompe quaternaire (LC-20AD) et équipé d'un détecteur UV à barrette de diodes SPD-20AD. La séparation a été réalisée en phase inverse avec une colonne Kinetex® 2.6 µm PFP 100 Å LC Column de dimension 100 x 4,6 mm (Phenomenex®). L'élution a été réalisée pendant 21 minutes en utilisant un mélange binaire de solvants : Eau ultra pure (solvant A) et acétonitrile (solvant B), acidifiés avec 0,1 % (v/v) d'acide orthophosphorique. La température du four était de 45°C et le débit de travail était de 1,1 mL/min. Le volume d'injection des échantillons était de 10 µL. Le contenu total en STLs a été exprimé par la somme des aires sous le pic de tous les STLs

détectés à 254 nm et une comparaison de ces contenus en STLs entre les différentes composantes a été réalisée par un test statistique Welch-ANOVA suivi d'un test post-hoc de Games-Howell.

3. Résultats.

3.1. Caractérisation des gènes de la voie de biosynthèse des STLs.

Aucun génome de chicorée industrielle n'étant disponible dans les banques de données publiques, l'obtention des séquences des gènes d'intérêt pour la chicorée ChicBitter002 s'est réalisée en 2 temps. Tout d'abord, l'identification des gènes *GAS*, *GAO* et *COS* impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs a été possible grâce à la réalisation d'un Blastp entre le génome de la chicorée witloof et les données disponibles dans la littérature. Cela a aussi permis d'identifier les structures exoniques et introniques de chacun des gènes. Enfin, les reads de ChicBitter002 issus d'un séquençage par RNA-seq ont été alignés contre les gènes *GAS*, *GAO* et *COS* identifiés dans le génome de la chicorée witloof afin d'obtenir la séquence nucléotidique de ces gènes.

3.1.1. Germacrène A synthase (GAS)

Un seul gène a été identifié en tant que forme longue de la *GAS* (*GAS-L*). Une prédiction *ab initio*, obtenue par analyses statistiques et informatiques de séquences protéiques, a permis de mettre en évidence que le gène *GAS-L* serait composé de 5 exons et 4 introns (**Figure 1.3., piste 1**). Or, en observant la piste 4 correspondant à la banque de séquences protéiques de *Lactuca sativa* et la piste 5, correspondant aux données de Bouwmeester *et al.* [2002], on peut observer une structure de 7 exons et 6 introns. Ceci est confirmé par la taille des séquences transcrites issues des données de RNA-seq de la chicorée witloof, représentées en piste 3. En prenant en compte ces éléments, ainsi que les données publiées de Bogdanović *et al.* [2019a], on peut affirmer qu'il y a eu une erreur dans la prédiction *ab initio* et que la structure du gène *GAS-L* comporte en fait 7 exons et 6 introns avec une taille comprise entre 4 000 et 5 000 pb. Par ailleurs, l'identification de ce gène, à proximité de marqueurs SSR, confirme sa présence sur le groupe de liaison 9 du génome de la chicorée, comme publié par Cadalen *et al.* [2010] et Bogdanović *et al.* [2019a]. Cette structure en 7 exons et 6 introns a ensuite été reportée sur les reads de ChicBitter002 afin d'obtenir la séquence génomique.

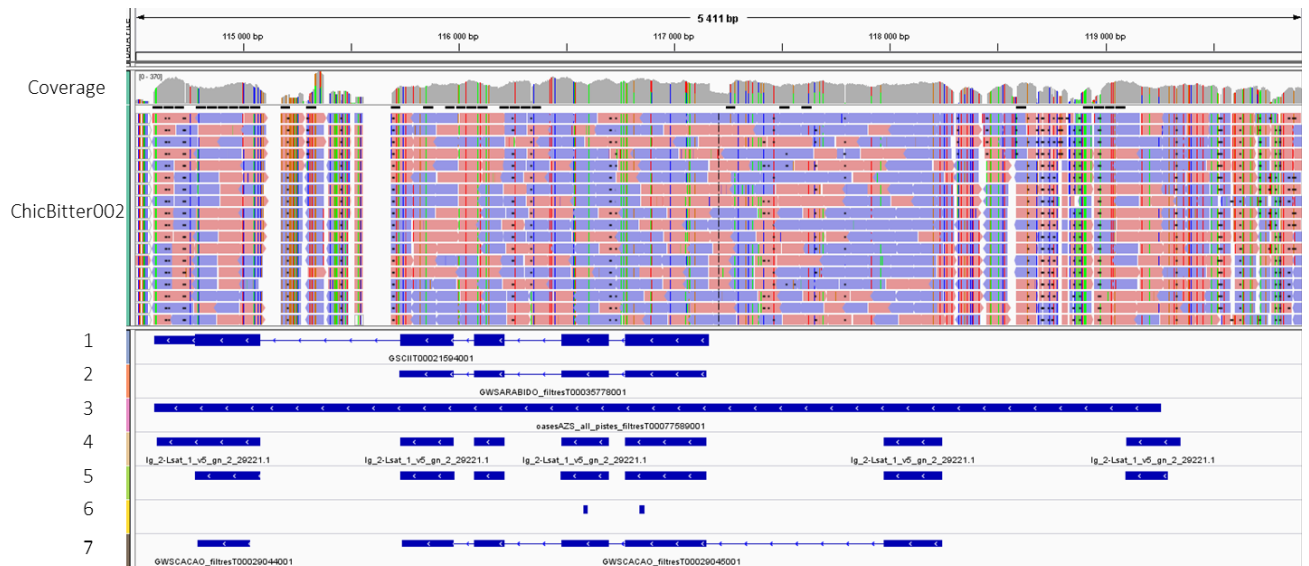


Figure 1.3. Structure du gène *GAS-L* visualisée par l'outil Integrative Genome Viewer. La comparaison et l'analyse des reads de ChicBitter002 sont réalisées à partir des différentes pistes 1 à 7. Piste 1 : séquence prédite de chicorée witloof, obtenue par le programme CARGESE ; Piste 2 : gène orthologue putatif d'*Arabidopsis thaliana* ; Piste 3 : séquence transcrite issue de données RNA-seq (programme CARGESE) ; Piste 4 : gène orthologue putatif de *Lactuca sativa* ; Piste 5 : séquence de chicorée industrielle issue de Bouwmeester *et al.* [2002] ; Piste 6 : marqueurs cartographiés chez la chicorée industrielle ; Piste 7 : gène orthologue putatif de *Theobroma cacao*.

Pour caractériser les formes courtes des gènes *GAS* (*GAS-S*), cinq gènes candidats ont été identifiés. Dans un premier temps, nous avons analysé la structure de ces 5 gènes. La prédiction *ab initio* sur le génome de la chicorée witloof semblait pencher pour une structure de gènes de 8 exons et 7 introns, or l'analyse des données protéiques supplémentaires, ainsi que l'erreur de prédiction commise pour le gène *GAS-L* permettent de remettre en question ces prédictions *ab initio*. Grâce à la comparaison avec les différentes banques de données protéiques, ainsi que les informations apportées par les données de Bouwmeester *et al.* [2002], les séquences transcrites issues de données RNA-seq de génome de chicorée industrielle et les données de Bogdanović *et al.* [2019a], les 3 premiers gènes candidats sont identifiés en tant que copies *GAS-S1*, *GAS-S2* et *GAS-S3* (Figure 1.4., Cadres A, B et C). Pour les deux derniers gènes candidats (*GAS-S4b* et *GAS-S5*), l'alignement des reads était imparfait et peu d'informations ont été procurées par l'alignement des banques de données protéiques. Cependant, la présence de séquences répétées de type LTR/Copia, correspondant à la séquence du rétrotransposon identifié par Bogdanović *et al.* [2019a], dans le 3^{ème} exon de la copie *GAS-S4b* permet d'identifier cette copie (Figure 1.5., Cadre A, piste 7). Concernant le gène candidat *GAS-S5*, il a pu être identifié comme une copie de *GAS-S* grâce à la présence de séquences transcrites de chicorée industrielle issues de RNA-seq (Figure 1.5., Cadre B, piste 3). Initialement, nous pensions que ce gène candidat correspondait à la copie *GAS-S4a*, précédemment identifiée par Bogdanović *et al.* [2019a], puisqu'un codon stop avait été identifié dans le 1^{er} exon, toutefois, l'analyse de la séquence en acide aminés de ce gène a révélé que l'exon 1 n'était qu'un artefact dû à une mauvaise prédiction et que le

début de la séquence se situait au niveau du 2^{ème} exon prédit, où un codon start était présent. Nous avons donc considéré que le dernier gène candidat est une nouvelle copie de la forme courte de la GAS et l'avons nommé *GAS-S5* (**Figure 1.5., Cadre B**). La prise en compte de tous ces éléments nous a permis de définir la structure des différentes copies géniques de la forme courte de la GAS. Ainsi, les 5 copies géniques du gène *GAS-S* sont composées de 7 exons et 6 introns, comme la forme longue de la GAS. Ces gènes font une taille comprise entre 2 000 et 3 000 pb et il semblerait que seules les copies *GAS-S1*, *GAS-S2*, *GAS-S3* et *GAS-S5* soient susceptibles de s'exprimer puisqu'aucun codon stop ou transposon n'a été détecté contrairement à la copie *GAS-S4b*. Le report de la structure des copies *GAS-S* sur les reads de la chicorée ChicBitter002 a permis d'identifier une seule séquence claire pour chaque copie génique excepté pour la copie *GAS-S5* où deux séquences alléliques présentant des variations nucléotidiques ont été identifiées. Ces deux séquences ont donc été notées allèle 1 et allèle 2.

L'alignement des séquences protéiques des copies *GAS-S* du génome de la chicorée witloof, de la chicorée ChicBitter002, et des banques BAC publiées par Bogdanović et *al.* [2019a], suivi par la construction d'un arbre phylogénétique, ont permis de montrer que les séquences protéiques des différentes bases de données utilisées se regroupent en fonction du numéro de la copie de *GAS-S* (**Figure 1.6**). L'arbre phylogénétique obtenu permet aussi de montrer que certaines copies sont plus proches phylogénétiquement que d'autres. En effet, d'un côté on peut voir un groupe formé par les copies *GAS-S1*, *GAS-S2* et *GAS-S3*, et d'un autre côté un groupe formé par les copies *GAS-S4a*, *GAS-S4b* et *GAS-S5* (**Figure 1.6**). Ces groupes sont eux-mêmes subdivisés en deux. Ainsi, il apparaît que les copies *GAS-S4a* et *GAS-S4b* partagent une forte proximité, ce qui concorde avec l'hypothèse de Bogdanović et *al.* [2019a] que ce sont les allèles d'un même pseudogène. Les copies *GAS-S1* et *GAS-S2* partagent aussi un fort taux d'identité dans leur séquence protéique. Cette proximité phylogénétique est confirmée par l'établissement d'une matrice d'identité à partir des séquences codantes des *GAS-S* de ChicBitter002. En effet, on peut voir que les cinq copies géniques de la forme courte de la GAS ont entre 83 et 98% d'homologie de séquence, avec *GAS-S1* et *GAS-S2* ayant le taux le plus élevé (**Tableau 1.1**).

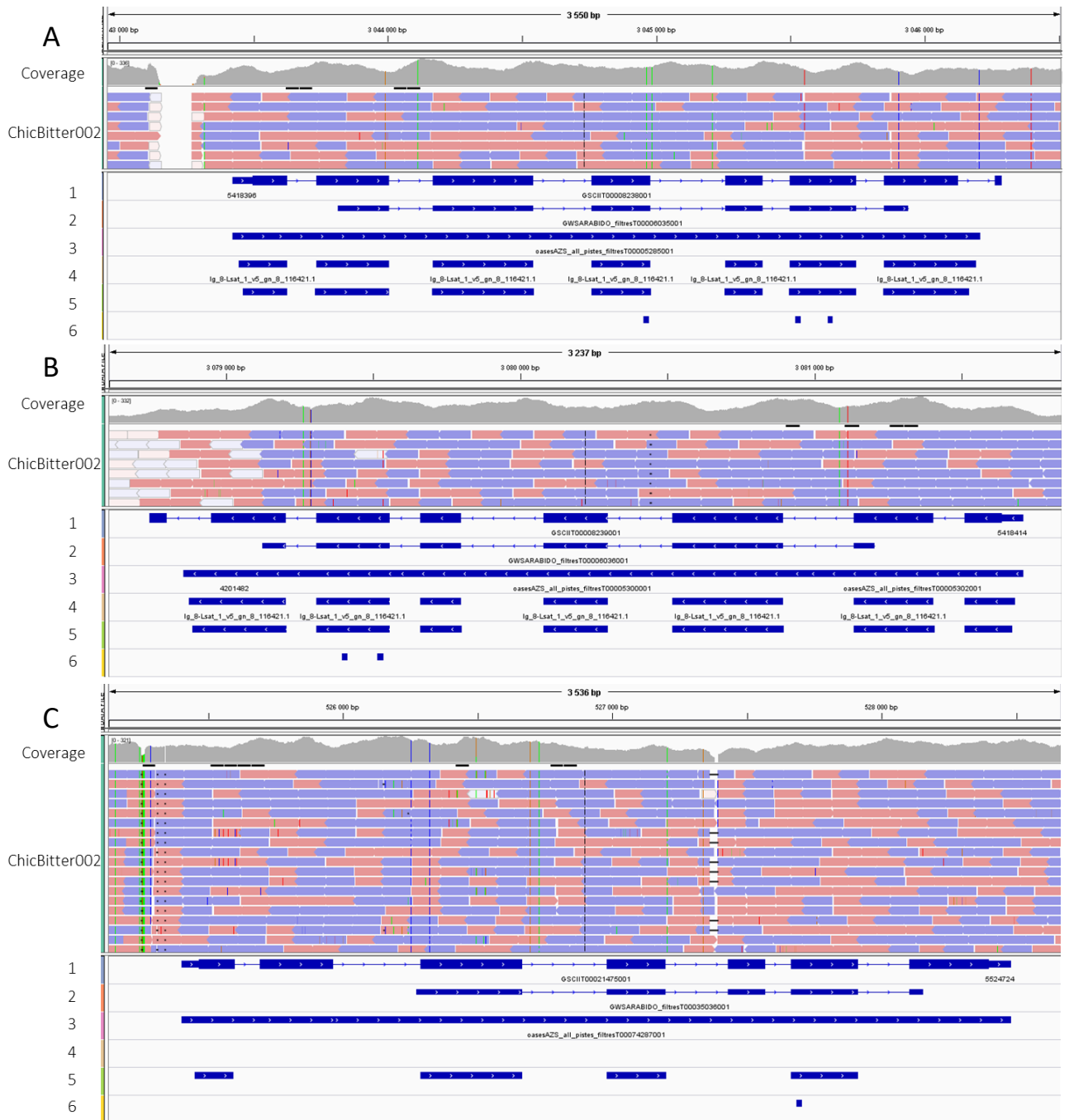


Figure 1.4. Visualisation des copies 1 à 3 du gène *GAS-S* sur l'outil Integrative Genome Viewer. La comparaison et l'analyse des reads de ChicBitter002 sont réalisées à partir des différentes pistes 1 à 6. Cadre A : *GAS-S1* ; Cadre B : *GAS-S2* ; Cadre C : *GAS-S3*. Piste 1 : séquence prédite de chicorée witloof, obtenue par le programme CARGESE ; Piste 2 : gène orthologue putatif d'*Arabidopsis thaliana* ; Piste 3 : séquence transcrite issue de données RNA-seq (programme CARGESE) ; Piste 4 : gène orthologue putatif de *Lactuca sativa* ; Piste 5 : séquence de chicorée industrielle issue de Bouwmeester *et al.* [2002] ; Piste 6 : marqueurs cartographiés chez la chicorée industrielle.



Figure 1.5. Visualisation des copies *GAS-S4b* et *GAS-S5* du gène *GAS-S* sur l’outil Integrative Genome Viewer. La comparaison et l’analyse des reads de ChicBitter002 sont réalisées à partir des différentes pistes 1 à 7. Cadre A : *GAS-S4b* ; Cadre B : *GAS-S5*. Piste 1 : séquence prédite de chicorée witloof, obtenue par le programme CARGESE ; Piste 2 : gène orthologue putatif d’*Arabidopsis thaliana* ; Piste 3 : séquence transcrite issue de données RNA-seq (programme CARGESE) ; Piste 4 : gène orthologue putatif de *Lactuca sativa* ; Piste 5 : séquence de chicorée industrielle issue de Bouwmeester *et al.* [2002] ; Piste 6 : marqueurs cartographiés chez la chicorée industrielle ; Piste 7 : banque de motifs répétés.

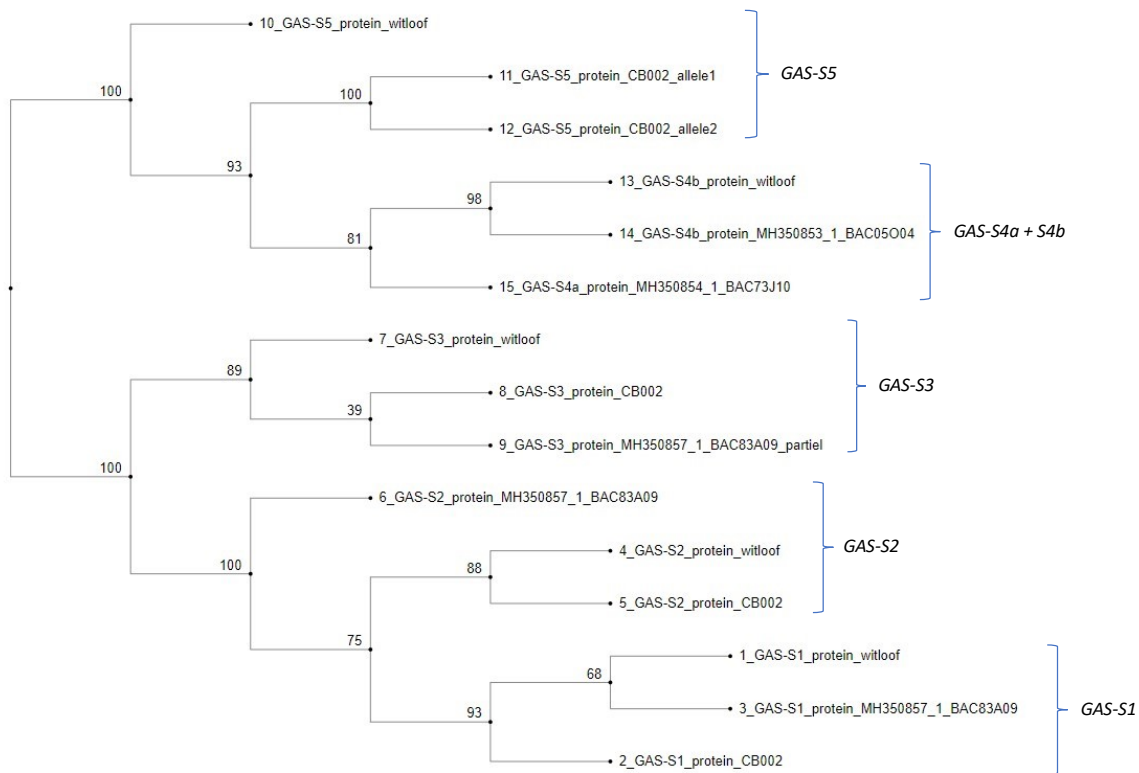


Figure 1.6. Arbre phylogénétique des copies du gène *GAS-S* identifiées dans différentes bases de données. L'arbre phylogénétique est réalisé à la suite d'un alignement protéique des séquences des 5 copies du gène *GAS-S* identifiées dans le génome de la chicorée witloof, dans le génome de la chicorée ChicBitter002 (CB002) et dans les banques BAC publiées par Bogdanović *et al.* [2019a]. L'identifiant du BAC est précisé par l'annotation « BACXXYXX ».

Les cinq copies géniques *GAS-S* ont été identifiées à deux endroits différents sur le génome de ChicBitter002. D'un côté, les copies *GAS-S1*, *GAS-S2* et *GAS-S3* ont été identifiées sur le même contig (contig_403_pilon) et à proximité les unes des autres. Les copies *GAS-S1* et *GAS-S3* sont séparées de ~ 85 000 pb avec le gène *GAS-S2* étant situé entre eux. Initialement, un seul gène annoté « *germacrène A synthase short form* » avait été identifié sur le locus du groupe de liaison 3 du génome de la chicorée [Cadalen *et al.*, 2010]. Grâce à la présence de marqueurs SSR, nous pouvons affirmer que les copies *GAS-S1*, *GAS-S2* et *GAS-S3* sont toutes présentes sur ce groupe de liaison 3, comme publié par Bogdanović *et al.* [2019a]. D'un autre côté, les copies *GAS-S4b* et *GAS-S5* ont été identifiées sur un second contig (contig_1740_pilon). Elles sont séparées de ~ 76 000 pb et ont été localisées à proximité de marqueurs SSR associés au groupe de liaison 6 du génome de la chicorée. La localisation des gènes *GAS-S* sur deux groupes de liaison différents souligne la division de ces copies géniques en deux groupes, comme visualisé lors de l'analyse phylogénétique des séquences protéiques (**Figure 1.5**)

Tableau 1.1. Pourcentage d'identité des séquences d'ADNc des copies du gène GAS-S.

| | <i>GAS-S1</i> | <i>GAS-S2</i> | <i>GAS-S3</i> | <i>GAS-S4b</i> | <i>GAS-S5</i> |
|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| <i>GAS-S1</i> | 100,00 | 98,09 | 89,21 | 93,95 | 85,09 |
| <i>GAS-S2</i> | 98,09 | 100,00 | 88,91 | 83,68 | 84,79 |
| <i>GAS-S3</i> | 89,21 | 88,91 | 100,00 | 90,88 | 92,02 |
| <i>GAS-S4b</i> | 83,95 | 83,68 | 90,88 | 100,00 | 92,03 |
| <i>GAS-S5</i> | 85,09 | 84,79 | 82,02 | 82,03 | 100,00 |

La matrice d'identité a été obtenue par l'outil ClustalOmega à la suite de l'alignement des séquences d'ADNc des 5 copies géniques du gène *GAS-S*. Les séquences codantes utilisées pour l'alignement proviennent des copies du gène *GAS-S* identifiées dans le génome de la chicorée ChicBitter002.

3.1.2. Germacrène A oxydase (GAO)

Pour l'identification du ou des gènes *GAO*, le Blastp réalisé entre les données publiées par Nguyen *et al.* [2010] et le génome de la chicorée witloof a permis d'identifier un seul hit à 99 % d'identité. L'alignement des séquences des différentes banques de données protéiques et des séquences transcrites issues de données RNA-seq, contre le gène candidat identifié dans le génome de la chicorée witloof a permis de confirmer l'appartenance de ce gène à la sous famille CYP71 des cytochromes P450 et la fonction d'oxydase (**Figure 1.7.**). L'analyse structurale a établi que le gène *GAO* est composé de 3 exons et qu'il fait une taille comprise entre 2 000 et 3 000 pb. Cette structure a ensuite été reportée sur les reads de ChicBitter002 afin d'obtenir la séquence génomique.

En outre, ce gène est identifié à proximité des copies *GAS-S1* à *GAS-S3* et sur le même contig, ce qui a permis de localiser le gène *GAO* sur le groupe de liaison 3 du génome de la chicorée industrielle.

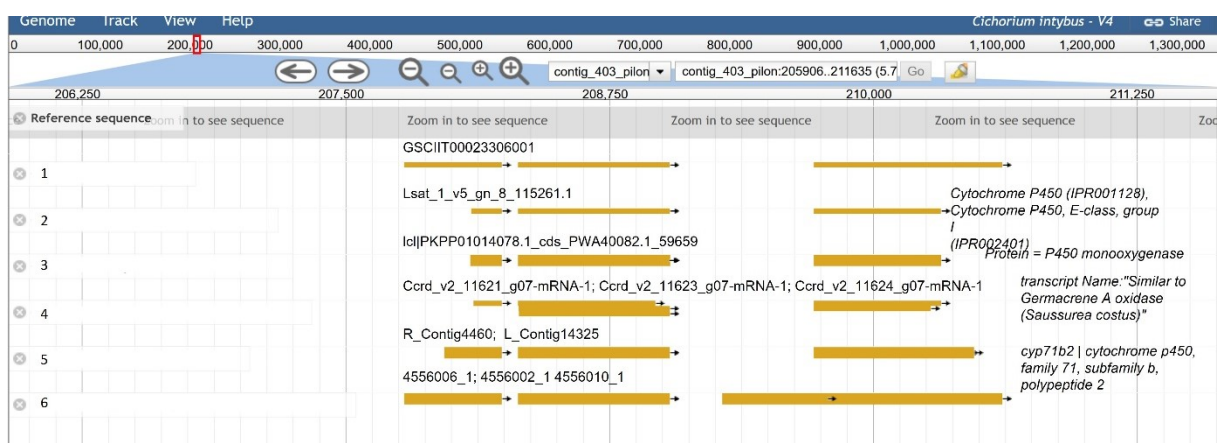


Figure 1.7. Structure du gène GAO visualisée sur l'outil Jbrowse. Piste 1 : séquence du gène *GAO* prédite de la chicorée witloof, obtenue par le programme CARGESE ; Piste 2 : gène orthologue putatif de *Lactuca sativa* ; Piste 3 : gène orthologue putatif de *Artemisia annua* ; Piste 4 : gène orthologue putatif de *Cynara cardunculus* ; Piste 5 et 6 : séquences transcrites de chicorée issues de données RNA-seq (programme Qualichic et CARGESE).

3.1.3. Costunolide synthase (COS)

Pour l'identification du ou des gènes *COS*, le Blastp réalisé entre les données publiées par Liu *et al.* [2011] et le génome de la chicorée witloof a permis d'identifier 3 gènes candidats. L'alignement des différentes banques de données protéiques et des séquences transcrites issues de données RNA-seq a permis d'attribuer la fonction de costunolide synthase à ces 3 gènes. On en déduit donc que l'enzyme COS est codé par plusieurs copies géniques, ce qui n'avait pas été décrit dans la littérature auparavant chez *C. intybus*. L'analyse structurale a permis d'établir que ces 3 copies du gène *COS* sont composées de 2 exons et que leur taille est comprise entre 1 500 et 2 000 pb. Le report des structures géniques identifiées sur les reads de la chicorée ChicBitter002 a permis l'obtention des séquences nucléotidiques et protéiques dont l'alignement a montré que les 3 copies géniques de *COS* partagent entre 83 et 95% d'homologie. En outre, ces gènes sont localisés sur le groupe de liaison 5 du génome de la chicorée industrielle.

3.2. Définition des cibles nécessaires pour l'édition des gènes par CRISPR/Cas9 dans la chicorée ChicBitter002.

L'objectif étant de réaliser un knock-out (KO) des différents gènes impliqués dans la voie de biosynthèse, une recherche de séquences cibles a été effectuée dans les régions exoniques des gènes *GAS-L*, *GAS-S*, *GAO*, et *COS* de ChicBitter002, à l'aide de l'outil CRISPOR (crispor.tefor.net) [Haeussler *et al.*, 2016]. Pour les gènes *GAS*, une liste de 36 séquences cibles potentielles a été établie. Cette liste comprend des séquences cibles communes à la forme longue et aux formes courtes des gènes *GAS*, des séquences cibles spécifiques de la forme longue du gène *GAS*, des séquences cibles spécifiques de chaque copie du gène *GAS-S* et des séquences cibles communes à toutes les copies du gène *GAS-S*. Pour le gène *GAO*, une liste de 27 séquences cibles potentielles a été établie. Concernant les gènes *COS*, une liste de 22 séquences cibles potentielles soit spécifiques de chaque copie *COS*, soit communes aux 3 copies, a été établie. Les séquences cibles sélectionnées ont été analysées par l'outil Cas-OFFINDER dans le but d'établir si elles pouvaient être retrouvées à d'autres endroits du génome de la chicorée ChicBitter002 et provoquer des mutations off-target. Les résultats obtenus ont été reportés sur le génome de la chicorée ChicBitter002 et comparés avec les différentes données précédemment utilisées (banques de données protéiques, séquences transcrites issues de données RNA-seq et prédiction de gènes) afin de sélectionner les cibles dont les sites off-target ne correspondaient pas à des régions codantes de gènes. Grâce à cette analyse, deux séquences cibles ont été définies pour cibler le 1^{er} exon de la forme longue du gène *GAS*. Pour les formes courtes du gène *GAS*, deux séquences cibles ont été définies, dont l'une présente dans le 3^{ème} exon de toutes les formes courtes du gène *GAS* sauf la copie *GAS-S4b* et l'autre présente dans le 3^{ème} exon des copies *CiGAS-S1*, *CiGAS-*

S2 et *CiGAS-S3*. Concernant le gène *GAO*, deux séquences cibles ont été définies dans le 1^{er} exon. Enfin pour les gènes *COS*, aucune séquence cible n'a pu être définie puisqu'elles étaient toutes retrouvées dans des sites off-target situés dans des régions codantes de protéines identifiées comme des cytochromes P450. Les séquences cibles définies sont schématisées dans la **Figure 1.8**.

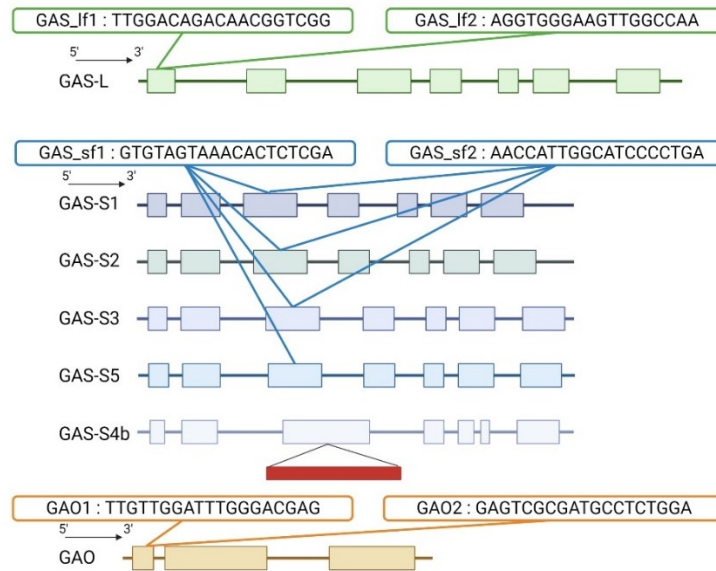


Figure 1.8. Représentation des gènes *GAS* et *GAO* et des régions ciblées par CRISPR/Cas9. Rectangles colorés : exons ; Lignes : introns ; *GAS-S* : formes courtes du gène *germacrène A synthase* ; *GAS-L* : forme longue du gène *germacrène A synthase* ; *GAO* : *germacrène A oxydase* ; *GAS_If1*, *GAS_If2*, *GAS_sf1*, *GAS_sf2*, *GAO1*, *GAO2* : cibles.

3.3. Recherche de variabilité dans des composantes de chicorées.

Dans le but de transférer le système d'édition par CRISPR/Cas9, à des fins appliquées, sur des chicorées présentant plus d'intérêt pour les sélectionneurs, l'étude des gènes impliqués dans la biosynthèse des STLs a été complétée par une analyse de variabilité de ces gènes chez 5 composantes de variétés de chicorée : les composantes ChicBitter003, ChicBitter004, ChicBitter005, ChicBitter006, ChicBitter007.

3.3.1. Préparation des bibliothèques d'ADN génomique des différentes composantes

Pour chacune des composantes de variétés de chicorée, un pool d'ADN constitué de l'ADN de 12 plantes, a été généré. L'amplification de ces pools d'ADN a permis d'obtenir des bibliothèques de fragments d'ADN génomique pour chaque composante, avec des fragments majoritairement compris entre 350 et 450 pb (**Figure 1.9**). Lors de l'amplification, des adaptateurs spécifiques ont été ajoutés aux fragments d'ADN de chaque composante, ce qui a permis de mélanger les bibliothèques de chaque composante afin de réaliser ce que l'on a nommé un « méga-pool ».

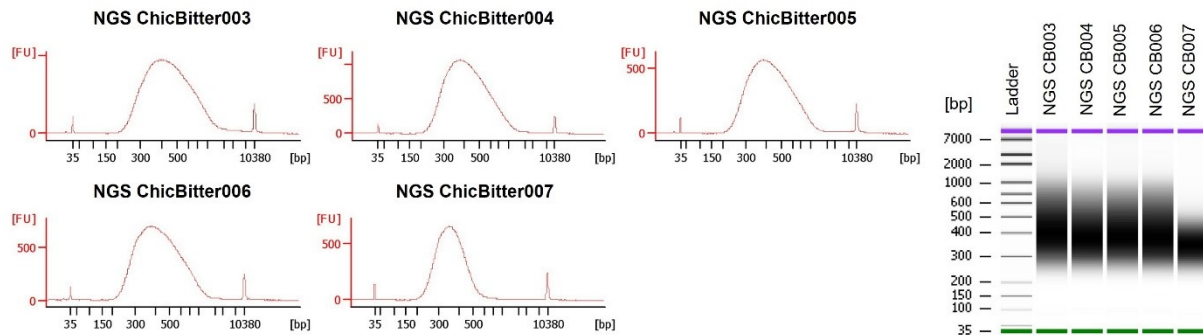


Figure 1.9. Vérification de la composition et de la qualité des librairies d'ADN de chaque composante via une puce à ADN. L'analyse de la puce à ADN est résumée sous forme d'électrophorégramme. Une importante concentration d'ADN est retrouvée pour les fragments de taille comprise entre 350 et 450 pb. Ladder : Echelle de poids moléculaires ; CB003 : ChicBitter003 ; CB004 : ChicBitter004 ; CB005 : ChicBitter005 ; CB006 : ChicBitter006 ; CB007 : ChicBitter007.

3.3.2. Analyse de la variabilité des différentes composantes de chicorée

Les données obtenues par le séquençage du méga-pool d'ADN ont été nettoyées par outils bio-informatiques et l'outil GATK a permis l'identification des variants alléliques des gènes *GAS*, *GAO* et *COS* entre les différentes composantes et la chicorée ChicBitter002. GATK est ce qu'on appelle un « variant caller » qui permet de mettre en évidence des variations nucléotidiques lors de la comparaison de données de séquençage avec un génome de référence.

L'étude des séquences exoniques des 5 copies de *GAS-S*, des gènes *GAS-L* et *GAO* ainsi que les 3 copies de *COS* ont permis de montrer qu'il y avait entre 0,624% et 0,957% de variabilité allélique, en moyenne, entre ChicBitter002 et les différentes composantes de chicorée analysées (**Tableau 1.1**). La composante ChicBitter004 semble avoir un taux de variabilité allélique plus élevé pour les 10 gènes analysés (0,957%) même si la composante ChicBitter006 possède un taux assez proche (0,923%) alors que la composante ChicBitter005 possède le taux de variabilité allélique le moins élevé (0,624%) par rapport à la chicorée ChicBitter002. Toutes composantes confondues, il semble que ce soit les gènes *GAS* (formes longue et courtes) qui soient les plus variables avec un taux variant de 1,121% à 1,514%, et que ce soit les gènes *COS* les moins variables (**Tableau 1.2**).

Tableau 1.2. Variabilité allélique (%) des 5 composantes de chicorée sur 10 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs, par rapport à la chicorée Chicbitter002.

| Composante | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| % de variabilité pour les gènes GAS | 1,229 | 1,514 | 1,121 | 1,237 | 1,268 |
| % de variabilité pour le gène GAO | 0,954 | 0,954 | 0,750 | 0,954 | 0,750 |
| % de variabilité pour les gènes COS | 0,135 | 0,403 | 0,000 | 0,578 | 0,022 |
| % de variabilité moyenne | 0,773 | 0,957 | 0,624 | 0,923 | 0,680 |

Les gènes étudiés sont les 5 copies du gène *GAS-S*, le gène *GAS-L*, le gène *GAO* et les 3 copies du gène *COS*. Le pourcentage de variabilité pour les gènes *GAS* est calculé par moyennage du taux de variation allélique pour chaque gène par rapport à la chicorée ChicBitter002, sur les 6 gènes *GAS* identifiés dans le génome de la chicorée industrielle. La même chose est réalisée pour le gène *GAO* et les gènes *COS*, en fonction du nombre de gènes identifiés. CB003 : ChicBitter003 ; CB004 : ChicBitter004 ; CB005 : ChicBitter005 ; CB006 : ChicBitter006 ; CB007 : ChicBitter007.

Une analyse plus détaillée de la variation allélique des composantes de chicorée a permis d'identifier que le taux élevé de variabilité des gènes *GAS* est dû à la forme longue de la *GAS*, avec des taux de variation allant de 1,487% à 2,230% mais aussi aux copies *GAS-S4b* et *GAS-S5* de la forme courte du gène *GAS* (**Tableau 1.3**). Les forts taux de variations alléliques sur ces deux copies sont prédictibles en raison de leurs caractéristiques respectives. En effet, la copie *GAS-S4b* possède un élément mobile au sein de son exon 3 qui peut s'être déplacé à l'intérieur de la séquence du gène, et la copie *GAS-S5* présente initialement une variabilité allélique dans le génome de la chicorée ChicBitter002 en raison des deux séquences alléliques identifiées à l'origine. Les résultats ont aussi montré que le faible taux de variation allélique retrouvé pour les gènes *COS* semblait être une caractéristique des 3 copies géniques puisqu'aucune différence avec les séquences de la chicorée ChicBitter002 n'a été détectée pour la composante ChicBitter005. De plus, la composante ChicBitter003 ne présente aucune variation allélique dans les copies *COS-1* et *COS-2* et la composante ChicBitter007 ne possède pas de différence avec ChicBitter002 dans les exons des copies *COS-2* et *COS-3* (**Tableau 1.3**). Les gènes *COS* appartenant à la famille des cytochromes P450, ce faible taux de variation allélique semble donc cohérent.

Tableau 1.3. Comparaison de variants alléliques entre plusieurs composantes de chicorée sur 10 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs .

| Gène | GAS-S1 | | | | | GAS-S2 | | | | | GAS-S3 | | | | | GAS-S4b | | | | | GAS-S5 | | | | | GAS-L | | | | | | | | | |
|--|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|----|----|----|----|----|
| | 1677 bp | | | | | 1677 bp | | | | | 1680 bp | | | | | 1509 bp | | | | | 1682 bp | | | | | 1749 bp | | | | | | | | | |
| Taille ADNc (basée sur CB002) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Composante | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | | | | | |
| Total de nucléotides variants détectés | 14 | 13 | 11 | 10 | 13 | 8 | 10 | 6 | 11 | 13 | 18 | 26 | 14 | 13 | 10 | 26 | 28 | 27 | 28 | 27 | 27 | 28 | 27 | 28 | 27 | 30 | 35 | 27 | 23 | 31 | 26 | 39 | 26 | 38 | 32 |
| Dont présent sur 1 seul allèle | 13 | 12 | 8 | 9 | 11 | 6 | 10 | 0 | 11 | 12 | 17 | 25 | 6 | 12 | 6 | 24 | 28 | 21 | 28 | 21 | 26 | 33 | 18 | 23 | 21 | 26 | 33 | 18 | 23 | 21 | 4 | 39 | 26 | 22 | 20 |
| Dont présent sur les 2 allèles | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 0 | 6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 8 | 1 | 4 | 2 | 0 | 6 | 0 | 6 | 4 | 2 | 9 | 0 | 10 | 22 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 16 | 12 |
| % de variation allélique | 0,835 | 0,775 | 0,656 | 0,596 | 0,775 | 0,477 | 0,596 | 0,358 | 0,656 | 0,775 | 1,071 | 1,548 | 0,833 | 0,774 | 0,595 | 1,723 | 1,856 | 1,789 | 1,856 | 1,789 | 1,784 | 2,081 | 1,605 | 1,367 | 1,843 | 1,487 | 2,230 | 1,487 | 2,173 | 1,830 | | | | | |

| Gène | GAO | | | | | COS-1 | | | | | COS-2 | | | | | COS-3 | | | | | | | | | |
|--|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1467 bp | | | | | 1548 bp | | | | | 1482 bp | | | | | 1485 bp | | | | | | | | | |
| Taille ADNc (basée sur CB002) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Composante | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 | CB003 | CB004 | CB005 | CB006 | CB007 |
| Total de nucléotides variants détectés | 14 | 14 | 11 | 14 | 11 | 0 | 1 | 0 | 7 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 11 | 6 | 13 | 0 | 8 | 0 | 6 | 13 | 0 | 8 | 0 |
| Dont présent sur 1 seul allèle | 11 | 12 | 2 | 11 | 4 | 0 | 1 | 0 | 7 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 11 | 6 | 13 | 0 | 8 | 0 | 6 | 13 | 0 | 8 | 0 |
| Dont présent sur les 2 allèles | 3 | 2 | 9 | 3 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| % de variation allélique | 0,954 | 0,954 | 0,750 | 0,954 | 0,750 | 0,065 | 0 | 0,452 | 0 | 0 | 0,270 | 0 | 0,742 | 0,067 | 0 | 0,404 | 0,875 | 0 | 0,539 | 0 | 0,404 | 0,875 | 0 | 0,539 | 0 |

Le pourcentage de variation allélique est calculé par la division du nombre total de nucléotides variants détectés par la taille de l'ADNc. La détection des variants est uniquement effectuée sur les exons des gènes. CB003 : ChicBitter003 ; CB004 : ChicBitter004 ; CB005 : ChicBitter005 ; CB006 : ChicBitter006 ; CB007 : ChicBitter007.

En parallèle de cette analyse de variabilité allélique, un dosage des STLs accumulés dans les racines des composantes ChicBitter003 à ChicBitter007 a été effectué. Le but de ce dosage était d'établir un lien entre la variabilité génétique et la variabilité en STLs des 5 composantes de chicorée et de prouver la présence ou non de variants alléliques pouvant être directement responsables d'une variation de la quantité de STLs. L'analyse du contenu total en STLs montre que les 5 composantes présentent une disparité dans la quantité de STLs accumulées dans les racines (**Figure 1.10**). Une différence significative du contenu total en STLs a pu être observée entre ChicBitter005 et les composantes ChicBitter003, ChicBitter004 et ChicBitter007 mais cela ne semble pas particulièrement lié à un gène puisque les taux de variation allélique de ChicBitter005 ne diffèrent quasiment pas de ceux des autres composantes. Une analyse de l'impact des variants alléliques dans les gènes *GAS*, *GAO* et *COS* a fait l'objet d'un stage de fin d'étude en 2022, réalisé par Louis Motte et encadré par Thierry Cadalen, et les résultats n'ont pas permis de conclure à une corrélation entre variant allélique et production de STLs, ce qui confirme les observations ci-dessus. Des analyses plus poussées dans les séquences régulatrices des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs sont prévues afin d'identifier des variations pouvant être à l'origine de ces différences phénotypiques.

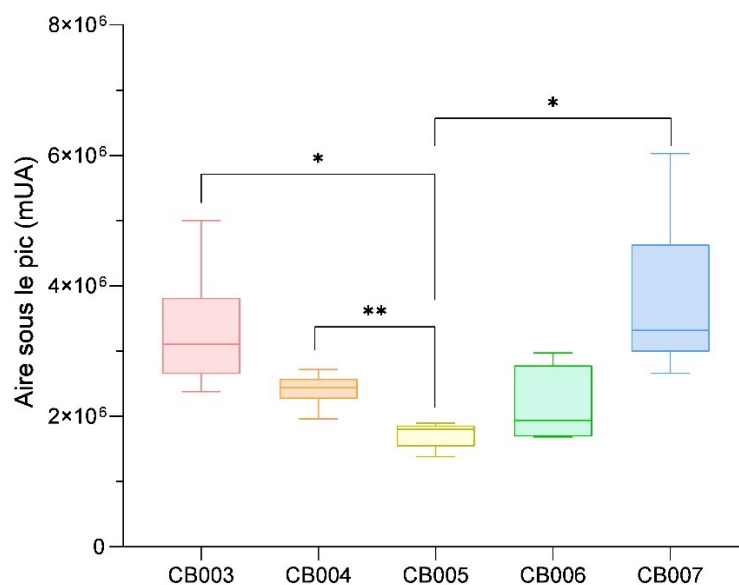


Figure 1.10. Contenu en STLs total dans les racines, âgées de 3 mois, des différentes composantes de chicorée. Le contenu total en STLs est exprimé en aire sous le pic (mUA) et correspond à la somme des aires sous le pic des STLs retrouvées dans les racines. Les analyses statistiques ont été obtenues par le biais d'un test Welch-ANOVA suivi d'un test post-hoc de Games-Howell. CB003 : ChicBitter003 ; CB004 : ChicBitter004 ; CB005 : ChicBitter005 ; CB006 : ChicBitter006 ; CB007 : ChicBitter007

3.3.3. Variabilité inter-génotype des cibles définies pour l'édition par CRISPR/Cas9.

Afin de muter les gènes *GAS-S*, *GAS-L* et *GAO*, plusieurs cibles ont été définies sur ces mêmes gènes à partir des séquences du génome de la chicorée ChicBitter002. Grâce à l'analyse de la variabilité allélique des composantes de chicorée Chicbitter003 à Chicbitter007, la présence ou l'absence de polymorphisme dans les séquences cibles a été établie. Pour le gène *GAS-L*, aucune variation nucléotidique n'est observée dans les 2 séquences cibles malgré la présence de variants dans l'exon 1 (**Tableau 1.4**). Concernant les gènes *GAS-S*, chacun d'entre eux présentent des variations nucléotidiques dans l'exon 3 mais aucune ne semble concerner les séquences cibles sauf dans le cas de la copie *GAS-S3* de la composante ChicBitter003. Cette copie présente la particularité d'avoir 3 variations de nucléotides dans la 2^{ème} séquence cible (**Tableau 1.4**). Enfin, le gène *GAO* ne détient qu'une seule variation nucléotidique identifiée dans la 2^{ème} séquence cible de toutes les composantes sauf pour ChicBitter007 (**Tableau 1.4**). Malgré la présence de polymorphisme dans quelques séquences cibles, les résultats obtenus permettent de conforter l'idée que les séquences préalablement définies dans la chicorée ChicBitter002 peuvent être utilisées pour une édition par CRISPR/Cas9 des 5 composantes ChicBitter003 à ChicBitter007. En effet, comme nous avons défini 2 séquences cibles par gène ou copie génique (sauf pour la copie *GAS-S5*), nous considérons donc que même si l'une des deux séquences est sujette à variation, la deuxième cible permet l'action du système CRISPR/Cas9.

Tableau 1.4. Variations nucléotidiques des exons et séquences ciblées par CRISPR/Cas9 dans différentes composantes de chicorée.

| Nombre de nucléotides variants dans... | CB003 | | CB004 | | CB005 | | CB006 | | CB007 | |
|--|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|----------------|
| | Exon | Séquence cible | Exon | Séquence cible | Exon | Séquence cible | Exon | Séquence cible | Exon | Séquence cible |
| <i>GAS-L</i> (exon 1) | 2 | 0 | 3 | 0 | 4 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>GAS-S1</i> (exon 3) | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| <i>GAS-S2</i> (exon 3) | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| <i>GAS-S3</i> (exon 3) | 5 | 3 (2 ^{ème} cible) | 13 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| <i>GAS-S5</i> (exon 3) | 3 | 0 | 5 | 0 | 2 | 0 | 6 | 0 | 5 | 0 |
| <i>GAO</i> (exon 1) | 1 | 1 (2 ^{ème} cible) | 1 | 1 (2 ^{ème} cible) | 1 | 1 (2 ^{ème} cible) | 1 | 1 (2 ^{ème} cible) | 0 | 0 |

4. Discussion

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre était d'identifier les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs afin d'obtenir leurs séquences nucléotidiques et de définir des cibles nécessaires à l'édition par CRISPR/Cas9 dans ces gènes. Les publications de Bouwmeester *et al.* [2002], Nguyen *et al.* [2010], Liu *et al.* [2011] et de Bogdanović *et al.* [2019a] ayant permis de fournir des informations sur le début de la voie de biosynthèse des STLs, les travaux réalisés dans ce chapitre ont permis de compléter les connaissances sur les gènes impliqués.

Basée sur les informations publiées sur les gènes *GAS*, la présence d'une seule copie du gène *GAS-L* sur le groupe de liaison 9 a pu être confirmée, ainsi que la présence de plusieurs copies du gène *GAS-S* : les copies *GAS-S1*, *GAS-S2*, *GAS-S3*, et *GAS-S4b* préalablement identifiées par Bogdanović *et al.* [2019a]. Notre étude a permis d'identifier la copie *GAS-S5* jusqu'alors jamais rapportée dans le génome de *C. intybus*. Par la caractérisation de ces gènes dans le génome de la chicorée, nous avons été en mesure de confirmer la localisation des 3 premières copies sur le groupe de liaison 3 du génome de la chicorée, comme décrit par Bogdanović *et al.* [2019a] et Cadalen *et al.* [2010], même si un seul gène avait été identifié comme *GAS-S* en 2010, tandis que les copies *GAS-S4b* et *GAS-S5* ont été localisées sur le groupe de liaison 6. Le gène *GAO* a aussi été localisé sur le groupe de liaison 3 à proximité des *GAS-S1* à *GAS-S3*, ce qui n'avait jamais été mentionné dans la littérature auparavant. Au cours de nos travaux, 3 copies codantes pour le gène *COS* ont pu être définies, complétant ainsi les informations sur ce gène où une seule séquence avait été identifiée dans le génome de *C. intybus* par Liu *et al.* [2011]. La récente publication d'un génome de chicorée fourragère (*C. intybus* L.) par Fan *et al.* [2022] permet de confirmer une partie de nos résultats. En effet, un Blastp des séquences protéiques de nos gènes *GAS-S* dans la base de données nr de NCBI a révélé 5 hits pour des prédictions protéiques (annotées KAI*****.1) du génome de *C. intybus* publié par Fan *et al.* [2022]. Parmi les 5 hits obtenus, 2 séquences (KAI3765465.1 et KAI3765466.1) semblent correspondre au début et à la fin du même gène. L'alignement des copies *GAS-S1*, *GAS-S2* et *GAS-S3* indique une homologie avec seulement 2 séquences prédites KAI3781194.1 et KAI3781197.1 (**Figure 1.11, Cadre A**). Cela signifie qu'une des copies de *GAS-S* n'est pas identifiée dans le génome de la chicorée fourragère. Ces séquences prédites sont aussi situées sur un groupe de liaison différent des séquences prédites KAI3765470.1, KAI3765465.1 et KAI3765466.1 qui, dans leur cas, montrent une forte homologie avec *GAS-S5* et *GAS-S4b* (**Figure 1.11, Cadre B**). On remarquera plus particulièrement KAI3765465.1 qui s'aligne avec le début de la séquence protéique de *GAS-S4b* et KAI3765466.1 qui s'aligne avec la fin de la séquence protéique de *GAS-S4b*. Dans l'ensemble, ces données confirment la présence de la copie *GAS-S5* nouvellement identifiée dans le génome de la chicorée, ainsi que la localisation des 5 copies du gène *GAS-S* sur 2 groupes de liaison différents.

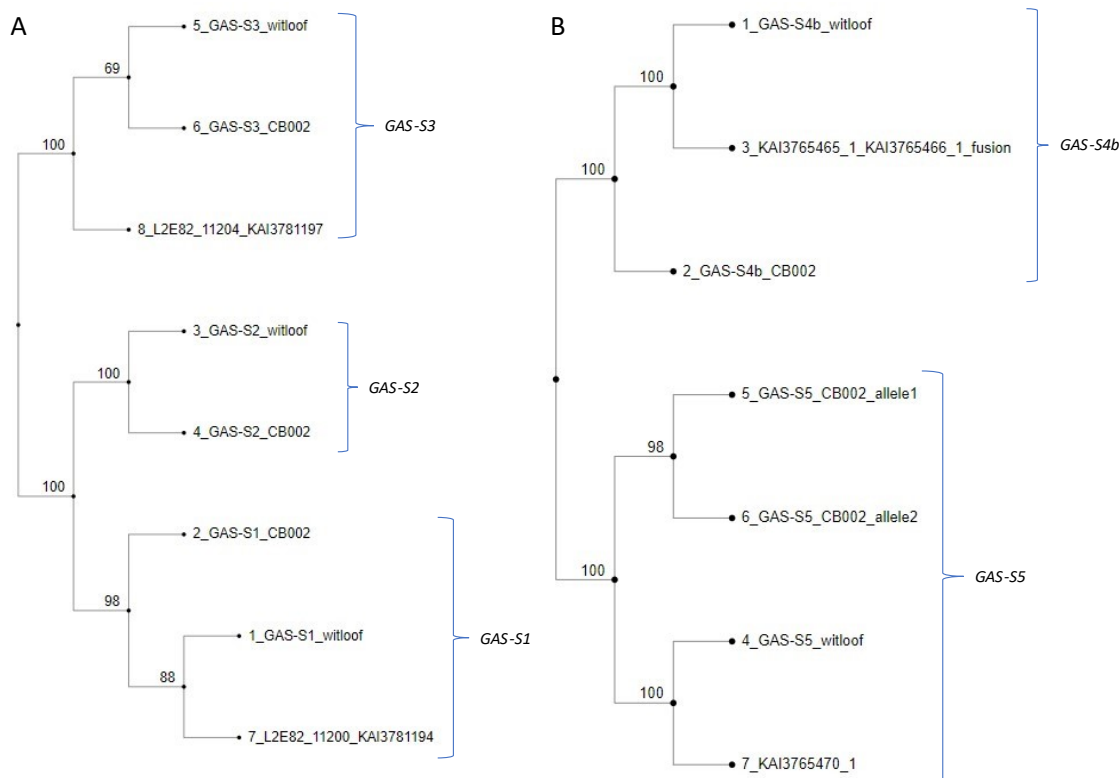


Figure 1.11. Arbre phylogénétique des copies du gène *GAS-S* identifiées dans différentes bases de données. L'arbre phylogénétique est réalisé à la suite d'un alignement protéique des séquences des 5 copies du gène *GAS-S* identifiées dans le génome de la chicorée witloof, dans le génome de la chicorée ChicBitter002 (CB002) et dans le génome de *C. intybus* Puna publiée par Fan *et al.* [2022]. L'identifiant des séquences prédites du génome de *C. intybus* Puna est précisé par l'annotation « KAI***** ».

L'élucidation de la voie de biosynthèse des STLs a fait apparaître une voie génétiquement complexe, notamment suite à l'identification de clusters de gènes codant pour la GAS, la COS et plus récemment, la KLS [Cankar *et al.*, 2022]. Sur les 4 enzymes impliquées dans la synthèse des STLs, seule GAO semble être codée par une seule séquence dans le génome de *C. intybus* mais des données récoltées dans le génome de *C. endivia*, une espèce proche de *C. intybus*, démontrent la présence de plusieurs gènes *GAO*. En effet, l'analyse d'un transcriptome de feuille de *C. endivia* [Testone *et al.*, 2019] a permis de mettre en évidence la présence de 3 gènes paralogues de *GAO* (dit gènes *GAO-like*) grâce à un BlastX effectué sur le génome de *L. sativa*. Cette analyse a aussi permis d'identifier 5 gènes *GAS-like* et 3 gènes *COS-like*, résultat semblable à nos données. Plus récemment, une étude de Zhang *et al.* [2022] a complété ces informations par l'analyse de données RNA-seq de 2 variétés de chicorée : *C. endivia* var. *crispum* (frisée), reconnue comme amère et *C. endivia* var. *latifolium* (scarole), considérée comme moins amère. Leur analyse a permis de mettre en évidence 96 gènes, codant pour 11 enzymes, impliqués dans la voie de biosynthèse des sesquiterpènes et des triterpènes dont 13 gènes *GAS-like*, 8 gènes *GAO-like* et 11 gènes *COS-like*. L'analyse de l'expression différentielle entre *C. endivia* var. *crispum* et *C. endivia* var. *latifolium* a aussi permis d'identifier que 5 gènes paralogues de

GAS, 5 gènes paralogues de *GAO* et les 11 gènes paralogues de *COS* étaient impliqués dans la modulation de l'amertume entre les deux variétés de *C. endivia* étudiées. Ces nouvelles données suggèrent que seule une fraction des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs a pu être mise en évidence dans la chicorée industrielle et que des recherches supplémentaires sont nécessaires pour valider la présence de ces gènes-like dans le génome de *C. intybus*. La validation de ces données permettrait de compléter les connaissances sur notre voie de biosynthèse afin d'établir de nouvelles cibles pour la modulation de l'amertume. Cependant, ces données restent à considérer avec précaution puisqu'elles ont été générées à partir du génome de *C. endivia*, qui reste une espèce différente de *C. intybus* et il a été récemment démontré que le génome de *C. endivia* contiendrait plus de gènes que la chicorée (63 781 vs. 53 946 gènes codants) [Fan *et al.*, 2022].

La caractérisation des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs et l'obtention de leur séquence a permis de définir des séquences cibles pour une édition par CRISPR/Cas9. La définition des cibles pour les gènes *GAS-L*, *GAS-S* et *GAO* a permis de mettre en place des cultures de chevelus racinaires édités par CRISPR/Cas9 pour la chicorée ChicBitter002 (**Chapitre 2**), mais aussi de transférer des protoplastes de différentes composantes de chicorée avec l'outil CRISPR/Cas9 (**Chapitre 3**).

CHAPITRE 2 : Edition par CRISPR/Cas9 des gènes impliqués dans la synthèse des STLs, via une transformation médiée par *R. rhizogenes*.

Avant-propos.

L'édition de gènes par CRISPR/Cas9 a été très utilisée ces dernières années pour de nombreuses plantes cultivées. Cet outil est exploité dans le but d'étudier la fonction des gènes ou juste pour améliorer les caractéristiques des plantes. Les premières utilisations de CRISPR/Cas9 dans les plantes remontent à 2013 avec l'édition de l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), du sorgho (*Sorghum bicolor*), du blé tendre (*Triticum aestivum*), du riz (*Oriza sativa*) ou encore du tabac (*Nicotiana benthamiana*) [Jiang *et al.*, 2013 ; Shan *et al.*, 2013 ; Xie et Yang, 2013 ; Nekrasov *et al.*, 2013]. Depuis ces travaux, ce système a été appliqué chez de nombreuses autres plantes. L'introduction du système CRISPR/Cas9 dans les plantes se fait par transformation génétique. Parmi les transformations génétiques les plus utilisées, on retrouve les transformations directes avec l'utilisation de méthodes chimique (ex : polyéthylène glycol (PEG)), physique (ex : biolistique) ou par impulsions électriques (ex : électroporation), ou les transformations indirectes avec l'utilisation de systèmes bactériens tels que la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ou *Rhizobium rhizogenes*. Certaines plantes pouvant se montrer récalcitrantes à ces transformations génétiques, des méthodes alternatives ont été développées. Ainsi, on peut trouver l'agro-infiltration, la micro-injection ou encore l'utilisation de liposomes [Rakoczy-Trojanowska, 2002] ou encore des techniques plus récentes comme l'induction *de novo* de méristèmes [Maher *et al.*, 2020].

Chez la chicorée industrielle, deux méthodes de transformation pour réaliser l'édition de gènes par CRISPR/Cas9 ont été mises au point au sein de notre laboratoire par Bernard *et al.* [2019] : la transformation médiée par *Rhizobium rhizogenes* et la transformation de protoplastes médiée par le PEG. Ces mises au point ont été réalisées en ciblant le gène *PDS* codant la *phytoène désaturase* dans le but de provoquer un albinisme chez les plantes mutées et permettre un screening rapide des mutants. Les deux méthodes ont permis d'obtenir des plantes albinos *in fine* mais ont chacune présenté des avantages et des inconvénients. D'un côté, la transformation médiée par *Rhizobium rhizogenes* a permis une obtention rapide de matériel végétal sous forme de chevelus racinaires, dont l'ADN a pu être extrait afin d'identifier des lignées mutantes. Les travaux de Bernard *et al.* [2019] ont permis d'estimer une efficacité de mutation par CRISPR/Cas9 de 31,25% pour cette méthode. De plus, les chevelus racinaires de chicorée présentant la particularité de générer spontanément des bourgeons, il a été possible de régénérer des plantes mutées à partir des lignées obtenues (**Figure 2.1**). Cependant, l'utilisation du système bactérien implique une intégration de gènes dans le génome de la plante hôte dont de l'ADN bactérien provoquant une modification du phénotype des plantes régénérées. D'un autre côté, la transformation de protoplastes médiée par PEG a permis de régénérer

des plantes entières à partir de cellules éditées avec aucune autre modification de phénotype que celle attendue. Cette transformation transitoire ne provoque pas d'insertion d'ADN étranger, bien que des fragments plasmidiques contenant le gène *cas9* ont pu être retrouvés dans 1/3 des plantes régénérées [Bernard *et al.*, 2019]. Cette méthode présente aussi l'inconvénient d'être longue avant l'obtention de plantes de taille exploitable (presque 6 mois) et l'efficacité de mutation de 4,5% reste assez bas.

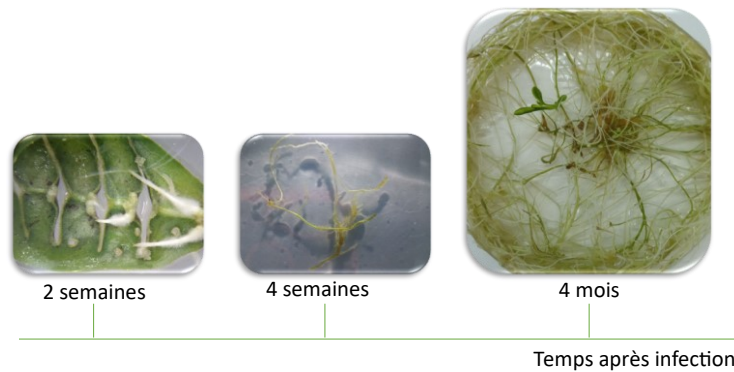


Figure 2.1. Processus de génération de chevelus racinaires de chicorée.

Dans ce chapitre 2, les travaux d'édition de génome qui seront présentés ont été réalisés via la méthode de transformation par *R. rhizogenes*.

R. rhizogenes (anciennement *Agrobacterium rhizogenes*) est une bactérie dont le mode d'infection est semblable à celui d'*A. tumefaciens* mais pour laquelle l'infection se caractérise par une production anarchique de racines appelées « chevelu racinaire ». Le relargage de composés phénoliques tels que l'acétosyringone par une plante blessée provoque une activation des gènes de virulence (gènes *vir*) de *R. rhizogenes*, responsables du transfert d'un fragment du plasmide Ri (pour Root-Inducing) dans le génome de la plante hôte [Gelvin, 2010]. Ce fragment, nommé ADN-T pour « ADN transféré », est bordé par des régions frontières « LB » et « LR » reconnues par les gènes *vir*. Cet ADN-T contient des gènes provoquant une modification du développement, de la physiologie et du métabolisme de la plante ainsi que des gènes responsables de la production d'opines [Mauro et Bettini, 2021]. Les différentes opines, servant de source de carbone et d'azote pour les bactéries, sont produites selon les souches bactériennes de *Rhizobium rhizogenes* permettant ainsi de les classer (**Tableau 2.1**).

Tableau 2.1. Type de plasmides Ri produisant des opines et leurs gènes de biosynthèse associés. [Modifié de Vladimirov et al., 2015].

| Type de plasmide | Souche | Gènes de biosynthèse des opines | Opines synthétisées |
|-------------------|------------|---|--|
| Agropine | A4, 15834 | T _L : <i>acs</i> (agrocinopine synthase) | Agrocinopines C et D |
| | | T _R <i>mas1, mas2</i> (mannopine synthases) <i>ags</i> (agropine synthase) | Mannopine , acide mannopinique Agropine , acide agropinique |
| Mannopine | 8196 | <i>mas1, mas2</i> (mannopine synthases) | Mannopine , acide mannopinique |
| Mikimopine | 1724 | <i>mis</i> (mikimopine synthase) | Mikimopine , mikimopine -lactame |
| Cucumopine | K599, 2659 | <i>cus</i> (cucumopine synthase) | Cucumopine , cucumopine -lactame |

Les différentes souches de *Rhizobium rhizogenes* peuvent contenir un ou deux ADN-T indépendants (**Figure 2.2**). C'est le cas des souches produisant de l'agropine, qui contiennent 2 ADN-T :

- Un ADN-T_R d'environ 8 à 20 kb, possédant une forte homologie avec le plasmide Ti retrouvé chez *A. tumefaciens*. Cet ADN-T_R contient les gènes de biosynthèse de l'auxine et des opines ainsi qu'un gène *rolB^{TR}* dont la fonction diffère du gène *rolB* (**Figure 2.2.A**) [Huffman *et al.*, 1984 ; Jouanin, 1984 ; Bouchez et Camilleri, 1990 ; Lambert et Tepfer, 1992 ; Lemcke et Schmülling, 1998 ; Pavlova *et al.*, 2014].
- Un ADN-T_L d'environ 15 à 20 kb dont la structure est proche du plasmide Ri retrouvé dans les souches de *R. rhizogenes* productrice de mannopine. Cet ADN-T_L contient 4 gènes *rol* responsables de la formation des chevelus racinaires (**Figure 2.2.A**) [White *et al.*, 1985 ; Slightom *et al.*, 1986 ; Vilaine et Casse-Delbart, 1987].

Les gènes *rol* introduits par l'ADN-T correspondent à 4 loci génétiques : *rolA*, *rolB*, *rolC* et *rolD*. Ces gènes sont capables d'altérer la synthèse d'auxines, de cytokinines et des hormones endogènes de la plante hôte afin de stimuler la formation de racines dans les tissus transformés.

Le transfert du ou des ADN-T est possible grâce à la présence de régions bordures nommés « LB » pour « Left Border » et « RB » pour « Right Border ». Ces régions bordures, d'une taille de 25 nucléotides, sont reconnues par les gènes de virulence impliqués dans le transfert de gènes entre la bactérie et la plante hôte. La connaissance de cette organisation a conduit à la mise en place d'un système de transformation binaire permettant le transfert de gènes étrangers. Ce système nécessite 2 éléments : un plasmide contenant des gènes d'intérêt à transférer chez la plante hôte, bordés par les régions bordures LB et RB, et une souche de *R. rhizogenes* possédant un plasmide Ri de type sauvage. Comme ce plasmide Ri code pour les gènes de virulence, ceux-ci seront capables de provoquer le transfert du plasmide contenant les gènes d'intérêt ainsi que du ou des ADN-T de la bactérie qui donneront le phénotype « chevelu racinaire » à la plante hôte. C'est grâce à ce système que Bernard *et al.* [2019]

ont pu réaliser l'introduction des éléments nécessaires à la mise au point de l'édition par CRISPR/Cas9 dans la chicorée industrielle.

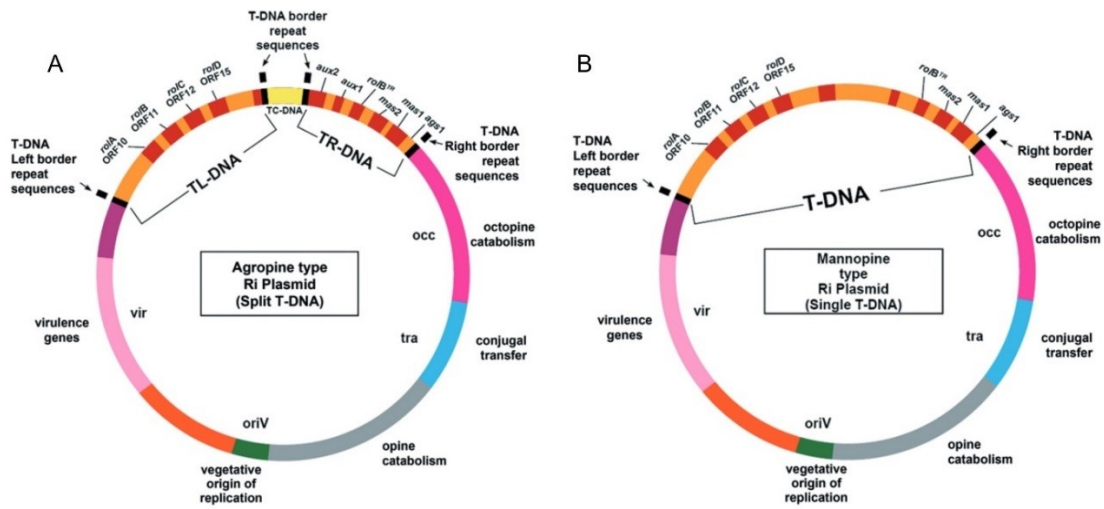


Figure 2.2. Représentation schématique de deux types de plasmide Ri de *R. rhizogenes* [Ozyigit et al., 2013]. A) représentation d'un plasmide Ri producteur d'agropine avec ses deux ADN-T ; B) représentation d'un plasmide Ri producteur de mannopine avec un seul ADN-T.

D'autres études ont aussi fait mention de l'utilisation du système d'édition CRISPR/Cas9 dans *C. intybus*. En 2020, De Bruyn *et al.* ont réalisé une édition par CRISPR/Cas9 des gènes *GAS*, *GAO* et *COS* sur des protoplastes de chicorée witloof. Bien qu'ils aient obtenu des mutants pour chacun de ces gènes, aucune information sur le contenu en STLs de ces plantes n'a été fournie dans leur article. En 2021, Cankar *et al.* ont publié une étude plus complète sur l'effet d'une édition par CRISPR/Cas9 des gènes *GAS* sur la production de STLs. Ils ont démontré que l'inactivation des copies *GAS-S1*, *GAS-S2* et *GAS-S3* provoquait une diminution du contenu en STLs, confirmant les travaux de RNAi réalisés par Bogdanović *et al.* [2019b]. Leurs travaux ont été complétés en 2022 par la publication de données montrant que l'inactivation des différentes copies du gène *KLS* provoquait aussi une diminution de la production de STLs [Cankar *et al.*, 2022].

Malgré la publication de ces travaux par des équipes de recherche concurrentes, mes travaux de thèse comportent des différences dans les résultats obtenus et ont permis d'apporter des informations complémentaires pour la compréhension de la voie de biosynthèse des STLs. Une édition par CRISPR/Cas9 médiée par *R. rhizogenes* a donc été réalisée pour les gènes *GAS* et *GAO* grâce aux séquences cibles définies dans le chapitre précédent. Dans un premier temps, l'édition de génome a été réalisée sur la chicorée ChicBitter002 puisqu'elle consiste en un matériel adapté à la recherche expérimentale. Les lignées de chevelus racinaires obtenues ont permis de régénérer des plantes mutées dont le contenu en STLs a été analysé. En addition de ce travail, des travaux d'analyse

sensorielle réalisés lors du stage de fin d'étude de Margaux Thiblet, sous l'encadrement de Philippe Hance, ont permis de corréliser le taux de STLs de nos plantes mutantes avec la perception de l'amertume par l'Homme. Le détail de ces travaux sera présenté sous la forme d'un article dans la première partie de ce chapitre. Cet article reprendra, par ailleurs, les données d'identification de gènes déjà présentées dans le chapitre 1. Dans un second temps, les plantes mutantes issues des chevelus racinaires ont fait l'objet d'analyses complémentaires avec un dosage du latex des feuilles et des essais de croisements et d'autofécondations. En effet, ces plantes étant issues de la chicorée ChicBitter002, elles gardent la capacité à s'autoféconder. Ces analyses ont permis d'une part, de confirmer les dosages réalisés sur les racines des chicorées mutantes, et d'autre part, d'observer la transmission des mutations générées par CRISPR/Cas9. Le système d'édition par CRISPR/Cas9 médié par *R. rhizogenes* étant très efficace, des essais d'édition des gènes *GAS*, *GAO* et *COS* ont aussi été réalisés avec la composante ChicBitter003. L'ensemble de ces analyses complémentaires feront l'objet d'une seconde partie.

CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of *CiGAS* and *CiGAO* to reduce bitterness in chicory (*Cichorium intybus* L.)

Justine Domont, Margot Thiblet, Audrey Etienne, Harmony Alves Dos Santos, Thierry Cadalen, Philippe Hance, David Gagneul, Jean-Louis Hilbert and Caroline Rambaud*

UMR Transfrontalière BioEcoAgro N° 1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, ISA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV, SFR Condorcet FR CNRS 3417- Institut Charles Viollette, Joint Laboratory CHIC41H, University of Lille-Florimond Desprez, Cité scientifique, 59655, Villeneuve d'Ascq, France

*Correspondence: caroline.rambaud@univ-lille.fr (Caroline Rambaud)

Author Contributions

TC, PH and CR designed the research study. JD, MT, AE and HADS performed the research. JD and TC analyzed the genomic data. MT and PH analyzed the sensorial data. JD and PH performed the statistical analysis. JD and CR conceptualized and drafted the manuscript. JD, TC, PH, DG, and CR reviewed and edited the manuscript. CR supervised the project. J-LH and CR provided fundings and administrated the project. All authors contributed to editorial changes in the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics Approval and Consent to Participate

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgment

We would like to thank Florimond Desprez SA for providing chicory products and access to the chicory ChicBitter002 genome database and the agrifood platform of Polytech Lille for the access to the laboratory rooms used for sensory analysis.

Special Note

The witloof sequence used in the identification of the sequences in the current article, also called CARGESE sequence, was obtained in the framework of the CARGESE program (2012-2014). It aimed to obtain an annotated chicory sequence through a partnership of 6 private companies (Rijk Zwaan, Enza Zaden, Bejo, Vilmorin, Hoquet Endives, Florimond Desprez) and the CEA (Genoscope, Commissariat à l'Energie Atomique, Evry, France). The RNA-seq data were obtained as part of the Qualichic program (2012-2016), a result of a collaboration between the University of Lille and the company Florimond Desprez.

Funding

This work has been supported by Région des Hauts-de-France via FEDER for CHIC41H 2019-2021 programs and via the Alibiotech CPER program. JD was supported by a doctoral fellowship from a convention ANRT/Florimond Desprez SA.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Chicory (*Cichorium intybus* L.), a member of the Asteraceae family, is known for its numerous health benefits, including its prebiotic, digestive, antioxidant or anti-inflammatory effects. Used as a coffee substitute, chicory roots are also appreciated for its bitterness, which can prove to be a disadvantage for other uses in food. The bitterness of chicory is largely linked to the presence of sesquiterpene lactones (STLs) in the roots. In order to create less bitter industrial chicory varieties, CRISPR/Cas9 technology was used to inhibit the first two genes of the STL biosynthetic pathway: germacrene A synthase (*CiGAS*), short form, and germacrene A oxidase (*CiGAO*). Biallelic mutations in two of the copies of *CiGAS-short* form or in the *CiGAO* gene led to a reduction in STL content of edited chicories. To determine the impact of these reductions on the perception of bitterness, a sensory analysis of 13 field-grown chicories genotypes, contrasting for their STL composition, allowed the construction of obtain a bitterness scale by correlating STL content with perceived bitterness. The edited chicories were positioned on this scale according to their STL content and a prediction of reduced or even unperceived bitterness was obtained for some mutants.

Keywords

Cichorium intybus L.; bitterness; sesquiterpene lactones; CRISPR/Cas9; hairy roots; germacrene A synthase; germacrene A oxidase

1. Introduction

Cichorium intybus L, also known as chicory, is a species belonging to the Asteraceae family widely used in traditional medicine. Its biological activities are mainly attributed to the accumulation of inulin, vitamins, and specialized metabolites such as sesquiterpene lactones (STLs), flavonoids, coumarins, hydroxycinnamic acids as well as alkaloids present in different parts of *C. intybus* L. [1]. In Europe, different varieties of chicory are cultivated either for the consumption of their leaves or for the use of their roots. In the North of France, *C. intybus* var. *foliosum* is commonly used as a salad and the taproot of *C. intybus* var. *sativum* (or industrial chicory) is grown for industrial purposes. Roots of industrial chicory are of economic importance for roasted ingredients, beverage processing such as coffee substitute, and inulin production. The concept of functional ingredients is increasingly developing due to the attraction of consumers towards healthier food. Chicory inulin is already considered as a functional ingredient due to its health effects and recently a new trend describing chicory flour as such has been developed [2-6]. Chicory flour, produced from roots, is mainly employed as supplement in baking since it improves the taste, the preservation, and the texture of bakery products in addition to being low in calories and rich in fibers. However, its incorporation is limited to 5% because chicory bitterness becomes too perceptible in larger proportions [7]. Bitterness plays a major role in food consumption and can cause an aversive reaction in consumers. By offering less bitter varieties of chicory, it will be possible to produce less bitter ingredients from chicory and, as a consequence, to integrate more chicory flour in bakery to benefit from its nutritional and functional qualities. Industrial chicory bitterness is mainly due to the presence of STLs [8-10]. These compounds represent on average 0.42% of the dry weight of the roots, making them the major specialized metabolites found in the root [11]. They belong to the class of guaianolides and are: lactucin, lactucopicrin, 8-deoxylactucin, their 15-oxalated and 15-glycosylated forms, and their derivatives 11(S),13-dihydro [12-14]. The biosynthesis of the guaianolides starts with the conversion of farnesyl-pyrophosphate (FPP) into germacrene A by germacrene A synthase (GAS) [15]. Four copies of *CiGAS* gene were identified in the industrial chicory genome, including a single copy of *CiGAS-long* form and three expressed copies of *CiGAS-short* form [16]. Then cytochrome P450 enzymes germacrene A oxidase (GAO) and costunolide synthase (COS) act consecutively to produce costunolide [17-20]. Recently, a new step of this biosynthetic pathway was revealed with the identification of the kauniolide synthase (KLS) gene cluster involved in the conversion of costunolide to kauniolide [21]. Genome editing approaches using CRISPR/Cas9 have developed rapidly in recent years in several plant species. They greatly accelerated gene function analysis or crop improvement to generate new varieties in a shorter time [22-24]. Its use allows to rapidly test strategy to reduce the bitterness of chicory in order to make it more acceptable for its use as a functional ingredient. In *C. intybus*, the

CRISPR/Cas9 editing system was first successfully used by Bernard *et al* [25] using two methods of transformation: *Rhizobium rhizogenes*-mediated transformation and protoplast transfection. Thereafter, the method was used to validate the function of genes involved in the biosynthesis of phenolamide in chicory pollen grains [26]. In parallel, CRISPR/Cas9 technology has been used in several studies to modify the level of STLs in *C. intybus*. First, De Bruyn *et al* [27] edited *CiGAS*, *CiGAO* and *CiCOS* genes of *C. intybus* var. *foliosum* through PEG-mediated protoplast transfection but the effects on the chemical phenotype was not described. Then Cankar *et al* [28] edited *CiGAS* genes of *C. intybus* var. *sativum* using the same editing transfection system and showed a strong reduction in the content of lactucin, lactucopicrin, 8-deoxylactucin and their oxalated forms. These results confirmed those of a previous study in which the *CiGAS* genes were silenced by an amiRNA approach [29]. Recently, Cankar *et al* [21] showed that knockout (KO) of *KLS* genes led to a nearly complete elimination of the major chicory STLs and their oxalate forms in leaves and roots of genome-edited chicories. They also investigated the presence of intermediates in the STL pathway and showed that there was no accumulation of compounds in the leaves, in contrast to the taproot where costunolide, its conjugates and germacrene A acid were detected. Despite these works, no sensory analysis was correlated with these results to determine the effect of STLs reduction on bitterness perception.

In the present study, in order to induce a modulation in STL content, industrial chicories ChicBitter002, cultivated for their roots, were edited with CRISPR/Cas9 technology using *R. rhizogenes*-mediated transformation. The *CiGAS-short* form and *CiGAO* genes, involved in the STL pathway were targeted. In addition, to link the STL content to the bitterness level, a sensory analysis was carried out on roots of several field-grown chicories. A linear correlation was established between the bitterness score associated with each of these chicories and their STL content. A bitterness scale was then generated and used to evaluate the bitterness of the genome-edited chicories based on their STL content. The involvement of the different targeted genes in the synthesis of STLs was also discussed.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

Field-grown chicories R01 to R13, furnished by Florimond-Desprez, are a breeding material chosen for their variability in the STL content based on the dosage of STLs conducted in 2018 and 2019 (unpublished data). They have been cultivated in 2020 (Coutiches, France) for their roots by Florimond-Desprez SA (Cappelle-en-Pévèle, France). As chicory is allogamous and not able to form stable lineages, each chicory R01 to R13 is a population sharing a common gene pool. For the sensory analysis, each field-grown chicory was furnished as a sample originating from a pool of all roots of three field plots.

ChicBitter002, is an *in vitro*-propagated industrial chicory clone, which genome has been sequenced by the Gentiane platform (INRAE, Clermont-Fermond, France) for Florimond Desprez SA (Cappelle-en-Pévèle, France). The clone ChicBitter002 was used in a wild-type form (Ctrl) or transformed by *R. rhizogenes* (HR lines).

2.2. Identification of *CiGAS* and *CiGAO* genes

Several *CiGAS* gene candidates were identified in the industrial chicory genome ChicBitter002 with Blastp or tBlastn algorithms using the *germacrene A synthase short form* gene (Uniprot accession: Q8LSC2) and the *germacrene A synthase long form* gene (Uniprot accession: Q8LSC3) from Bouwmeester et al [30] as queries and with 26367 'high probability' predictive gene models from the Chicbitter002 sequence (unpublished database, Florimond Desprez SA, Cappelle-en-Pévèle, France) and 31631 predictive gene models from a witloof chicory genome (CARGESE program) or their complete genome sequences as subjects. Nucleotide sequences of significant hits were aligned to the Chicbitter002 sequence using GMAP and their positions were compared to corresponding positions of predictive gene models of recently sequenced Asteraceae, such as *Lactuca sativa*, *Cynara cardunculus* var. *scolymus*, *Artemisia annua* and transcript sequences from unpublished RNA-seq data in industrial and witloof chicories [31-34]. The sequence of the *CiGAO* gene (Uniprot accession: D5JBW8) was used to identify candidates using the same procedure as for *CiGAS* genes. The *CiGAS* gene candidates were used as queries in a tBlastn procedure by comparing them to the BAC clone sequences previously published [16]. Multiple protein sequence alignment from the whole set of *CiGAS* sequences was carried out using MAFFT (Supplementary Fig. 1) [35].

2.3. CRISPR/Cas9 vector construction

Guide RNAs (sgRNAs) for *CiGAS-short* form and *CiGAO* genes were designed using the software CRISPOR (crispor.tefor.net) based on their GC content and their Doench score [36]. Two sgRNAs were defined for each gene except the gene *CiGAS-S5* for which only one target could be defined (Supplementary Table 1). Potential off-targets were checked with the tool Cas-OFFINDER and verified on the chicory ChicBitter002 genome (unpublished sequence, Florimond Desprez SA, France) to avoid the disruption of off-target gene coding region [37]. Two binary expression vectors for CRISPR/Cas9 were constructed as described previously [25, 38]. Briefly, each sgRNA was inserted by digestion/ligation into an intermediate plasmid pKanCiU6-1p-sgRNAscaffold, which includes *C. intybus* U6-1p promoter and a sgRNA scaffold. Four vectors containing the cassette “CiU6-1p-Guide-sgRNAscaffold” were obtained. Adaptors for Golden Gate restriction/ligation method were added to the end of each cassette by PCR using PrimeStar HS polymerase (Takara Bio Europe, St-Germain-en-

Laye, France) using primers GG1-F & GG1-R (Supplementary Table 1) for plasmid containing CiGAS_T1 and CiGAO_T1 guide and primers GG2-F & GG2-R (Supplementary Table 1) for plasmid containing CiGAS_T2 and CiGAO_T2 guide. PCR products were purified with NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kits (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and were cloned in pYLCRISPR/Cas9P_{35S}-B (Addgene plasmid #66190, Cambridge, MA, USA) by Golden Gate restriction/ligation method. Final plasmids pYLCRISPR-GASshort containing CiGAS_T1 and CiGAS_T2, and pYLCRISPR-GAO containing CiGAO_T1 and CiGAO_T2 were obtained.

2.4. Generation of chicory transformed plants.

In vitro plants of *C. intybus* L. ChicBitter002 clone were used in this study. Plants were maintained on H10 solid medium as previously described [25]. Wild-type *R. rhizogenes* 15834 strains (provided by Marc Buée, INRAE, Nancy, France) were transformed with pYLCRISPR-GASsh or pYLCRISPR-GAO by electroporation. Wild-type (WT) strains or transformed strains of *R. rhizogenes* were used to generate hairy root (HR) lines from ChicBitter002 chicory. HRs were obtained and maintained in hormone-free media as previously described and spontaneous shoots regenerated from HRs were transferred in H10 medium [25]. A selection of HR mutant lines and control plants were grown in pots for a period of 3 months in a S2 greenhouse. Genomic DNA from HRs was extracted using NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) using the manufacturer's protocol. *RoIB* specific primers were used to confirm *R. rhizogenes* infection, and *Cas9* presence was checked by PCR using primer pair C9-F and C9-R (Supplementary Table 1).

2.5. Genotyping and sequencing of edited HR chicory plants

Genotyping of HRs was realized to select mutant lines. Primer pairs GAO and S1 to S5 (Supplementary Table 1) labelled with different fluorescent dyes (6-Fam or Hex) were designed to amplify the sequences of *GAO* gene or each potentially expressed copy of *CiGAS-short* form gene. The PCR assay was performed in a volume of 15 µL containing 1X PCR buffer with 2 mM MgCl₂, 100 µM of each dNTP, 0.2 mg/mL BSA, 133 nM of each primer, 0.3 U Taq polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 2 ng of template DNA. A touchdown (TD) procedure was applied: 5 min denaturation at 94°C, followed by (a) 5 cycles of 30 sec at 94°C, TD 30 sec at 60°C (-1°C per cycle), 30 sec at 72°C and (b) 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 30 sec at 72°C, before 10 min of extension at 72°C. The PCR products were analyzed on a 3100 Avant Genetic Analyzer capillary sequencer (Applied Biosystems). Genotyping data were automatically collected and analyzed (GeneMapper Software v3.5). Sequences of mutated genes were obtained by Sanger sequencing using S1 to S5 primers pairs

for *CiGAS-short* form genes and one GAO primer pair for *CiGAO* gene (GATC service, Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany).

2.6. Determination of the STL content in chicory materials

Roots of edited chicories (n = 3 for each HR lines), WT 3-month-old chicories (n = 4) and field-grown chicories (R01 to R13) taproots were freeze-dried and powdered. Hundred mg of powder were extracted with 1 mL of water (LC-MS grade) under agitation (1400 rpm; Eppendorf ThermoMixer C, Hamburg, Germany) for 15 min at 35 °C. The supernatants were collected by centrifugation (15 min, 4 °C, 21 000 g) and boiled for 10 min at 100 °C under agitation (600 rpm). All aqueous extracts were finally filtered through a 0.45 µm PP Whatman UNIFILTER microplate (Cytiva, VWR, Rosny-sous-Bois, France) and transferred to vials for LC-UV analysis. STLs content was determined using an Ultimate 3000RS system equipped with an LPG-3400RS pump, a WPS-3000TRS autosampler and a DAD-3000RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Chromatographic separation was achieved on an Uptisphere Strategy PHC4 column (3 µm, 150 x 3 mm; Interchim, Montluçon, France) at 50 °C with 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (B) and 0.1% (v/v) formic acid in water (A) as mobile phases at flow rate of 0.6 mL/min. The gradient elution was as follows: isocratic at 10% B for 2.5 min; linear from 2 to 30% B in 40 min; linear from 30 to 85% B in 1 min; isocratic at 85% B for 2 min; linear from 85 to 10% B in 1 min; and isocratic at 10% B for 4 min. The injection volume was 5.0 µL. Fifteen STLs compounds were profiled based on this method and determined by LC-QTOF-HRMS analysis. Total STLs content, in all the analyses, was expressed as the sum of the peak areas of these 15 compounds, present in the UV chromatogram at 254 nm.

2.7. LC-QTOF-HRMS analysis of sesquiterpene lactones

STL compounds were identified using an Ultimate 3000RS system equipped with a DAD-3000RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), interfaced with a high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometer and equipped with an ESI source (Impact II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). One gram of freeze-dried powdered chicory root from the pool of field-grown chicories (R01-R13) was extracted with 10 ml of water (LC-MS grade) under agitation (1000 rpm) for 15 min at 35°C. After centrifugation (15 min, 4 °C, 21 000 g) , the supernatant was immediately evaporated, and the residue was resuspended in 2% acetonitrile (v/v) containing 0.1% formic acid (v/v) and passed through a 0.2 µm hydrophilic PTFE syringe filter (Merck, Darmstadt, Germany) and transferred to a vial for LC-MS analysis. Chromatographic separation was achieved on an Uptisphere Strategy PHC4 column (2.2 µm, 150 x 3 mm; Interchim, Montluçon, France) at 30 °C with 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (B) and 0.1% (v/v) formic acid in water (A) as mobile phases at flow rate of

0.5 mL/min. The gradient elution was as follows: isocratic at 2% B for 1 min; linear from 2 to 50% B in 32 min; linear from 50 to 100% B in 5 min; isocratic at 100% B for 7 min; linear from 100 to 2% B in 5 min; and isocratic at 2% B for 7 min. The injection volume was 2.0 μ L. The mass spectrometer was operated in the positive electrospray ionization mode at 4,5 kV with the following parameters: nebulizer gas (N_2), 2.4 bars; dry gas (N_2), 10.0 mL/min; dry temperature, 250 °C; collision cell energy, 10.0 eV; end plate offset, 500 V. Sodium formate cluster ions were applied for instrument mass calibration and for re-calibration of individual raw data files. The acquisition was performed in full scan mode in the 90 - 1200 m/z range with an acquisition rate of 1 Hz and with mass accuracy < 5 ppm. Software Compass otofControl 4.1 was used for the operation of the mass spectrometer and for data acquisition, and data were processed by the software Compass DataAnalysis 4.4 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

2.8. Construction of bitterness reference scale

The sensory evaluation was performed at the agrifood platform of Polytech Lille (University of Lille, France) in laboratory rooms according to ISO 8589:2007. The panel was constituted from volunteers recruited among the personnel of the University of Lille and trained in accordance with ISO 8586:2012. Panelists were first selected based on their ability to recognize bitterness, sweetness, saltiness, and sourness. Four series of different concentrations of taste solutions in water were prepared by dilution of stock solutions as followed: bitter with caffeine (concentrations: 0.27, 0.35, 0.46, 0.59 g.l⁻¹), sweet with sucrose (concentrations: 12, 24, 48, 96 g.l⁻¹), salty with sodium chloride (concentrations: 2, 4, 8, 16 g.l⁻¹) and sour with citric acid (concentrations: 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 g.l⁻¹); the lowest dilutions corresponding to the perception threshold for the substance evaluated. Participants were first asked to identify the four tastes for each concentration, as well as pure water blank. Subsequently, they ranked the different concentrations using a 10 cm horizontal line. Each test was repeated twice. Fourteen panelists were retained and to familiarize themselves with the bitterness of chicory, additional training with solutions of free STLs was performed. The six solutions were prepared according to the concentration range of free STLs from 0.62 mM to 0.019 mM, from a serial dilution of chicory root extract enriched in free STLs [39]. The solutions, including a pure water solution as a blank, were presented in plastic glasses accompanied with a plastic drop-pipette to pour solution into the mouth. Participants were invited to taste seven milliliters of each dilution with two replications. They were asked to rate the different solutions according to the bitterness intensity using a 7-point ranking; the rank 1 corresponding to the least intense perceived concentration. At the end, twelve panelists were selected for the quantitative sensory evaluation. Finally, freeze-dried root powders from field-grown chicories (R01 to R13) were evaluated by the panel for their bitterness intensity according to

ISO 6658:2017. The samples were served on plastic cups labeled with random three-digit numbers. The panelists were asked to rank the samples using a 10 cm horizontal line and evaluation was repeated twice in two sessions. The bitterness reference scale was constructed based on a simple linear regression model plotting bitter taste in function of relative total STL content. The bitterness degree of the samples from the roots of edited-chicory plants was then predicted by fitting their total STL content by means of the regression curve equation.

2.9. Statistical analysis

An ANOVA and Student's t-test were performed to determine panelist performance (discrimination ability, consensus in notation, repeatability) and to test for bitterness differences between the chicory root samples from the field-grown chicories (R01-R13). Comparison of STL content of edited and WT 3-month-old chicories and assessment of the differences in panelist perception of bitter taster were tested by non-parametric ANOVA (Kruskal-Wallis) followed by post-hoc uncorrected Dunn's test or post-hoc paired Wilcoxon, respectively. The assumptions of normality, homogeneity of variance, and independence were checked by Shapiro-Wilk test, Bartlett test, and Durbin-Watson test, respectively. The bitterness correlation with STL content was established by Pearson's correlation test. The significance threshold was set to 0.05 for all statistical tests. All analyses were done with R Statistics 4.0.3 and GraphPad Prism 9 software.

3. Results

3.1. Identification of *CiGAS* and *CiGAO* genes

The genome of the industrial chicory ChicBitter002 was searched to identify *CiGAS* and *CiGAO* genes putatively involved in the STL pathway. A single copy of *CiGAO* gene was highlighted in the genome of ChicBitter002 (Supplementary Fig. 2). For *CiGAS* genes, quite similar data to Bogdanovic et al [16] were found with one gene for *CiGAS-long* form and five gene copies of *CiGAS-short* form. Sequence analysis confirmed the existence of *GAS-S1*, *GAS-S2*, *GAS-S3* and *CiGAS-S4b* but *CiGAS-S4a* was not found. However a new *CiGAS-short* form candidate copy, named *CiGAS-S5*, was highlighted (Fig. 1). Sequence analysis confirmed that copies *CiGAS-S1*, *CiGAS-S2*, *CiGAS-S3* and *CiGAS-S5* could be expressed with a complete 7-exons structure and that copy *CiGAS-S4b* has a retrotransposon into the exon 3 that could hamper its expression. The five copies were identified at two different locations in the genome. On the one hand, *CiGAS-S1*, *S2* and *S3* were located on the same contig (contig_403_pilon) so they can be considered as three distinct genes but physically close on the chicory genome. Indeed, the *CiGAS-S1* and the *CiGAS-S3* are separated by ~85,000 bp, with *CiGAS-S2* in

between (Supplementary Fig. 3). It can also be noted that *CiGAO* gene is present on the same contig as the three *CiGAS-short* form genes, and ~85,000 bp away from the *CiGAS-S3* copy (Supplementary Fig. 3). On the other hand, *CiGAS-S4b* and *S5* also shared the same contig (contig_1740_pilon) and are ~76,000 bp apart. Based on these results, 4 copies of *CiGAS-short* can be considered as putatively expressed : copies *S1*, *S2*, *S3* and *S5* (Fig. 1). Since the copy *S4b* was presumably not expressed due to the presence of a retrotransposon, it was not targeted.

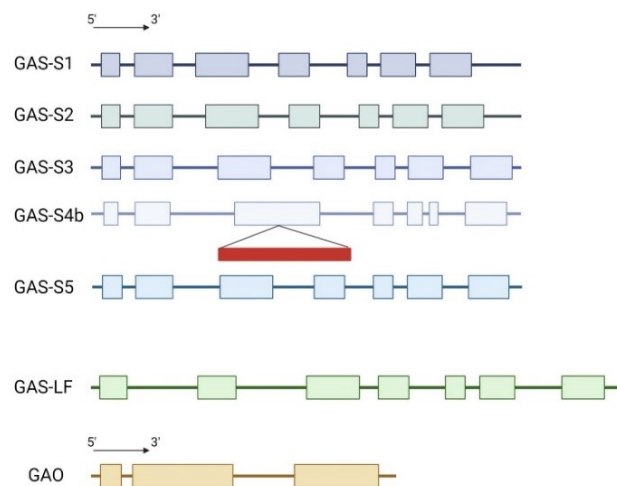


Figure 1. Schematic representation of the structure for *CiGAS* and *CiGAO* genes. *GAS-S* stands for the *CiGAS-short* form and *GAS-LF* stands for the *CiGAS-long* form. The exons and introns lengths are proportional to the nucleotide sequences of the genes. Colored box: exon, line: intron, red rectangle: retrotransposon.

3.2. Targeting of *CiGAS* and *CiGAO* genes

The objective was to perform a KO of the 4 putatively expressed copies of *CiGAS-short* form and of the *CiGAO* gene. In order to design sgRNAs for the four putatively expressed copies of *CiGAS-short* form, the homology of these genes was investigated by comparing their exonic sequences using ClustalOmega software [40]. All the putatively expressed copies (*CiGAS-S1* to *S5*) are relatively close since they share between 86 to 97% identity. *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2* sharing the highest identity (Supplementary Fig. 4). The newly identified *CiGAS-S5* copy shares 86-93% identity with the other copies, confirming its link to the multiple copies of *CiGAS-short* form (Supplementary Fig. 4). The high level of homology between the potentially expressed copies of *CiGAS-short* form did not allow specific targeting of each copy, but it was possible to design sgRNAs in the third exon to target all copies simultaneously. Since a single copy of *CiGAO* was identified, two sgRNAs were designed at the beginning of the first exon in order to disrupt the gene function.

The use of the CRISPOR tool to determine the potential targets gave a list of sgRNAs that were then analyzed using the Cas-OFFINDER tool to search for potential off-targets. The results were checked on the ChicBitter002 genome, to avoid selecting sgRNAs with off-targets in gene coding regions. Finally, two sgRNAs were identified in the first exon of *CiGAO* and two sgRNAs were identified in the third exon

of *CiGAS-S1*, *CiGAS-S2* and *CiGAS-S3*. For the *CiGAS-S5* copy, a single sgRNA common to the other copies was defined (Supplementary Table 1). The *GAS-long* gene was not targeted because it has been demonstrated to have minimal impact on STLs production in chicory roots [28].

Table 1. Overview of the mutation events in chicory transformed with *R. rhizogenes* with different constructs.

| Genes | | <i>CiGAS-short</i> | <i>CiGAO</i> | Control |
|---|-----------------------|--------------------|--------------|---------|
| Initial number of HR lines | | 54 | 31 | 6 |
| | Total | 43 | 30 | 6 |
| | WT | 30 | 24 | 6 |
| Number of lines with binary vector | 1 copy mutated (KO) | 6 (3) | 6 (2) | 0 |
| | 2 copies mutated (KO) | 4 (1) | nc | nc |
| | 3 copies mutated (KO) | 3 (1) | nc | nc |
| | 4 copies mutated (KO) | 0 (0) | nc | nc |
| Mutation frequency | | 30.2% | 20.0% | 0.0% |
| Gene KO frequency | | 11.6% | 6.6% | 0.0% |

HR: Hairy Root; WT: Wild-Type lines; KO: Knock-Out due to the onset of premature stop codon; nc: not concerned. Mutation frequency was calculated by dividing the sum of mutant lines by the total of lines with binary vector. Gene KO frequency was calculated by dividing the sum of (KO) by the total of lines with binary vector.

3.3. Identification of the CRISPR/Cas9 mutagenesis events and characterization of the HR mutant lines

Chicory leaves of 14-day-old vitroplants were infected with *R. rhizogenes* strain 15834 transformed with the binary vectors pYLCRISPR-GASshort or pYLCRISPR-GAO. Two weeks after *R. rhizogenes* transformation, selection of HRs based on their phenotype was carried out. Eighty-five HR lines were collected with 54 lines potentially transformed with the vector targeting the *CiGAS-short* form genes and 31 lines potentially transformed with the vector targeting the *CiGAO* gene. After verification of the presence of the T-DNA of *R. rhizogenes* and the integration of the binary vector, the number of transformed lines was reduced to 43 for *CiGAS-short* and 30 for *CiGAO* (Table 1). As integration of the binary vector is not always synonymous of mutation, a preliminary sorting of the mutants was performed by genotyping. Indeed, the action of CRISPR/Cas9 can generate a variety of mutated alleles and because multiple copies of *CiGAS-short* were highlighted, it is possible that all copies are not mutated at the same time. Then, a Sanger sequencing of the mutant HR lines identified by genotyping was performed to obtain the sequences of the mutants. Out of the 43 lines transformed with pYLCRISPR-GASshort, analysis of the mutations revealed 6 lines with one copy of *CiGAS* gene

mutated, 4 lines with two mutated copies and 3 lines with three mutated copies, resulting in a mutation rate of 30.2% (Table 1). HRs transformed with pYLCRISPR-GAO showed a mutation rate of 20% with 6 mutated lines out of 30 transformed lines (Table 1). As the chicory genome is diploid, the CRISPR/Cas9 system can induce two types of mutations. On the one hand, a monoallelic mutation could occur. In such case, one allele is mutated and the other remains wild-type (heterozygous) leading to an absence of full KO of the targeted gene. On the other hand, editing could generate a biallelic mutation where both alleles are mutated, either with the same mutation on each allele (homozygous), or with a different mutation (also heterozygous) that can lead to a KO of the gene. (Table 2 and Fig. 2). Most of the identified mutations were small insertions of one nucleotide (HR1, HR2, HR4, HR5, HR6, HR8, HR9, HR10, HR12, HR13, HR14, HR16, or HR18) or small deletions of less than 10 nucleotides (HR1, HR2, HR5, HR6, HR7, HR9, HR10, HR11, HR13, HR15, HR17, HR18, or HR19), but in some case, larger deletions were found between the two targets T1 and T2 as shown for HR4, HR7, HR8, HR12, HR12*, HR15 and HR17 (Fig. 2). Some mutations cause a change in the coding frame leading to the KO of a gene or a gene copy and the potentially premature termination of protein translation. This type of event was observed for 5 HR lines mutated on *CiGAS-short* genes: 3 lines mutated on a single copy (HR1, HR2 and HR4), 1 line mutated on two copies (HR8) and 1 line mutated on 3 copies (HR12*); and in 2 HR lines mutated on *CiGAO* (HR18 and HR19) resulting in a gene KO frequency of 11.6% and 6.6% respectively (Table 1, Table 2). The *R. rhizogenes*-mediated transformation is a stable transformation, meaning that the T-DNA is inserted into the plant genome. As a result, the *Cas9* gene is integrated into the genome of HR lines and can continue to exert its action and cause mutations. This case can be observed for the lines HR12 and HR12*. Originally, HR12 had a mutation on both *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2* copies but after a few months, an additional mutation appeared on the *CiGAS-S5* copy. For the rest of the paper, we will focus on only few mutants (HR2, HR3, HR9, HR12, HR12*, HR16 and HR18) to see which mutation event can affect the STL production.

Table 2. Summary of mutations found in hairy root lines for each target of the different copies of *CiGAS-short* and for *CiGAO* genes.

| Line | <i>CiGAS-short</i> | | | | | | | | <i>CiGAO</i> | |
|-------|--------------------|--------|----------|--------|-------|-------|-------|---------|--------------|-------|
| | S1 | | S2 | | S3 | | S5 | | T1 | T2 |
| | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T2 | T1 | T1 | T2 | |
| HR1 | -3/-3 | +1/+1 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR2 | WT/WT | -5/+1 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR3 | WT/WT | WT/-41 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR4 | WT/WT | WT/WT | +1/+1-45 | +1/-45 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR5 | WT/WT | WT/WT | WT/+1 | WT/-6 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR6 | WT/WT | WT/WT | WT/+1 | WT/-6 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR7 | WT/-31 | WT/-31 | WT/WT | WT/-10 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR8 | WT/-29 | +1/-29 | WT/WT | +1/-1 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR9 | WT/WT | WT/-5 | WT/+1 | WT/-6 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR10 | WT/WT | WT/-5 | WT/+1 | WT/-6 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR11 | WT/WT | WT/-10 | WT/WT | WT/-3 | WT/WT | WT/WT | WT/-7 | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR12 | WT/-29 | +1/-29 | WT/WT | +1/+1 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR12* | WT/-29 | +1/-29 | WT/WT | +1/+1 | WT/WT | WT/WT | +1/-1 | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR13 | WT/WT | WT/+1 | WT/WT | +1/-41 | +1/-3 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT |
| HR14 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/+1 |
| HR15 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | -12/-22 | WT/-7 | WT/WT |
| HR16 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/+1 | WT/WT | WT/WT |
| HR17 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/-22 | WT/-6 | WT/WT |
| HR18 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | +1/-8 | WT/WT | WT/WT |
| HR19 | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | WT/WT | -7/-7 | WT/WT |

Mutation leading to a change in the coding frame are in red. Larger deletion between the two targets (inter-guide deletion) are underlined. T1: Target 1; T2: Target 2; WT: Wild-Type; +: insertion; -: deletion.

| A | | Target 1 | PAM | PAM | Target 2 | T1/T2 |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|-------------------------|--|--------|
| <i>CiGAS-S1</i> | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | HR2.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| | HR2.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCA - - - - - TGCCAATGGTTGAGG | WT/-5 |
| | HR3.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | HR3.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATC - - - - - (...) - - - - - TCT | WT/-41 |
| | HR9.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | HR9.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCAT - - - - - GATGCCAATGGTTGAGG | WT/-5 |
| | HR12.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| | HR12.2 | AAGAGTGTAGTAAACA - - - - - | (...) | - - - - - | GGGGATGCCAATGGTTGAGG | -58 |
| <i>CiGAS-S2</i> | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | HR4.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | +1/+1 |
| | HR4.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTTC - - - - - | (...) | - - - - - | GTT | +1/-90 |
| | HR9.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | HR9.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCA - - - - - TGCCAATGGTTGAGG | +1/-6 |
| | HR12.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| | HR12.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| <i>CiGAS-S5</i> | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGGTAA</u> | (...) | GTTCCATCATGGGATGACCCTGGTCGAGG | WT |
| | HR12*.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTACGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | +1 |
| | HR12*.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTACGA | <u>AGGCAA</u> | (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | +1 |
| B | | PAM | Target 1 | PAM | Target 2 | T1/T2 |
| WT | TCGCCACTCGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | | | WT/WT |
| HR14.1 | TCGCCACTCGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCA - AGGCATCGCGACTCCCAA | | | WT/-1 |
| HR14.2 | TCGCCACTCGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCAAGAGGCATCGCGACTCCCAA | | | WT/+1 |
| HR15.1 | TCGCCACTC - - - - - | ACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | | -12/WT |
| HR15.2 | TCGCCACTC - - - - - | - - - - - | GAGGCATCGCGACTCCCAA | | | -29 |
| HR16.1 | TCGCCACTCGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | | | WT/WT |
| HR16.2 | TCGCCACTCGGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | | | +1/WT |
| HR17.1 | TCGCCACTCGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | | | WT/WT |
| HR17.2 | TCGCCACTC - - - - - | - - - - - | AGAGGCATCGCGACTCCCAA | | | -27 |
| HR18.1 | TCGCCACTCAGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | | | +1/WT |
| HR18.2 | TCGCCACTC - - - - - | ATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | | -8/WT |
| HR19.1 | TCGCCACTCGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCC - - - - - | TCGCGACTCCCAA | | WT/-7 |
| HR19.2 | TCGCCACTCGTCCCAAATCCAACAAA | <u>AAGCGCCT</u> | TCC - - - - - | TCGCGACTCCCAA | | WT/-7 |

Figure 2. Examples of sequences obtained by CRISPR/Cas9 editing. A) Sequence analysis of the two alleles of hairy root lines transformed with pYLCRISPR-GASshort construct. B) Sequence analysis of the two alleles of hairy root lines transformed with pYLCRISPR-GAO construct. The target sequences are in blue, and the PAM sequences are underlined. Mutations are highlighted in red and the changes in the nucleotide sequences are shown on the right of each allele. HR.x.x: Hairy Root x allele x; WT: Wild-Type; T1: Target 1; T2: Target 2; +: insertion; -: deletion.

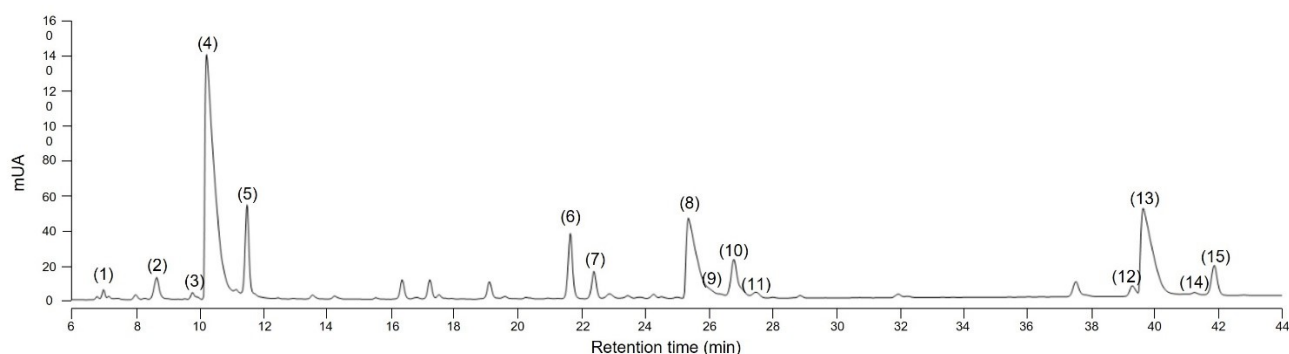


Figure 3. HPLC chromatogram at 254nm of sesquiterpene lactones in root of the wild-type chicory ChicBitter002. (1) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin-15-glycoside (DHLC-gly); (2) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin-15-oxalate (DHLC-ox); (3) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin (DHLC); (4) Lactucin-15-oxalate (Lc-ox); (5) Lactucin (Lc); (6) 8-deoxylactucin-15-glycoside (dLc-gly); (7) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin-glycoside (DHdLc-gly); (8) 8-deoxylactucin-15-oxalate (dLc-ox); (9) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin-15-oxalate (DHdLc-ox); (10) 8-deoxylactucin (dLc); (11) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin (DHdLc); (12) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucopicrin-15-oxalate (DHLp-ox); (13) Lactucopicrin-15-oxalate (Lp-ox); (14) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucopicrin (DHLp); (15) Lactucopicrin (Lp). Identity of the molecules was confirmed by mass spectrometry.

3.4. Presence of different STL forms in the chicory materials

Several methods to extract sesquiterpene lactones from chicory roots have been described using various solvents, but a method more representative of physiological conditions of human consumption was desired, since the objective of our project is to use industrial chicory root as functional eaten ingredient. Using water, an aqueous extract rich in sesquiterpene lactones was obtained with 15 compounds detected at a wavelength of 254 nm in the WT chicory ChicBitter002: lactucin, 8-deoxylactucin, lactucopicrin and their 11(S),13-dihydro derivatives, in addition of their oxalated forms and some glycosylated forms (Fig. 3). The same extraction method was used for the field-grown chicories used in sensory analysis and their STL composition was compared to that of the WT chicory ChicBitter002 “Ctrl” grown under controlled conditions (*in vitro* then in greenhouse). Fifteen identified compounds are present in all chicories, but a quantitative disparity was observed between the field-grown chicories (R01-R13) and the chicory “Ctrl” (Fig. 4A). As a general trend, the lactucin-15-oxalate and 8-deoxylactucin-15-glycoside content appeared to be higher in “Ctrl” plants compared with the field-grown chicories, whereas the different forms of 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin were in lower quantities. These differences could be due to the growing conditions or genotypic. However, if the distribution of STL content was examined according to the lactucin-like, 8-deoxylactucin-like, and lactucopicrin-like groups, the difference between chicories would fade, as would the total STL content (Fig. 4B). In the following analyses, the STL content of the chicories were therefore compared by considering their total STLs obtained by the sum of the 15 compounds detected in Fig.3. This is based on the hypothesis that taking into account all STLs is a good indicator of bitterness. Indeed, the different studies on chicory have not clearly established a compound more

involved than another in bitterness and when consuming chicory-based products, the consumer does not taste the STLs separately in his mouth but perceives them as a whole and detects a bitter taste.

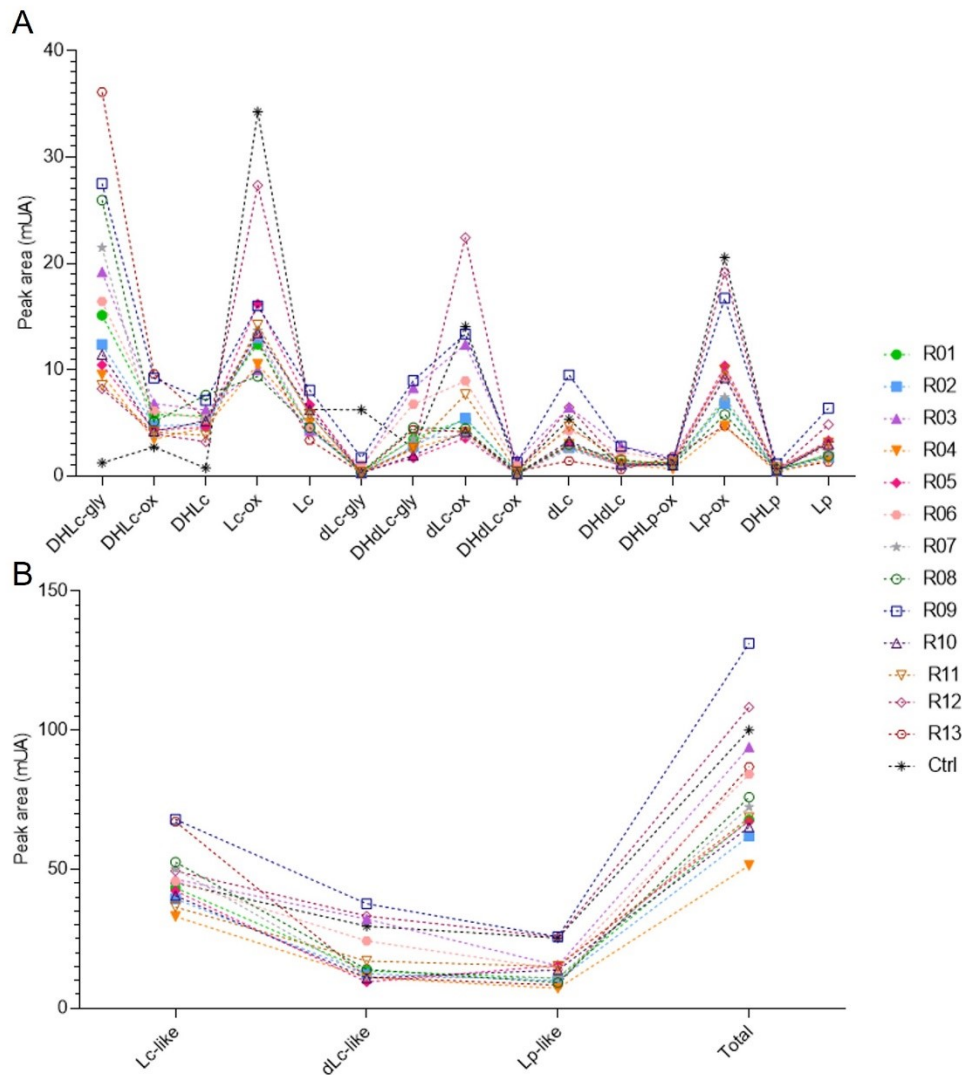


Figure 4. STL content in roots of chicories according to their peak area (mUA) obtained by HPLC analysis. Panel A) represents the distribution of each STL into the roots of chicories. Panel B) represents the STL levels of each chicories according to their structural group (Lc-like, dLc-like or Lp-like) and the total STL content of them. R01 to R13 are field-grown chicories used for sensorial analysis. Ctrl is wild-type ChicBitter002 grown under controlled condition. DHLC-gly: 11(S),13-dihydrolactucin-15-glycoside; DHLC-ox: 11(S),13-dihydrolactucin-15-oxalate; DHLC: 11(S),13-dihydrolactucin; Lc-ox: Lactucin-15-oxalate; Lc: Lactucin ; dLc-gly: 8-deoxylactucin-15-glycoside; DHdLc-gly: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin-glycoside; dLc-ox: 8-deoxylactucin-15-oxalate; DHdLc-ox: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin-15-oxalate; dLc: 8-deoxylactucin; DHdLc: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin; DHLp-ox: 11(S),13-dihydrolactucopiricin-15-oxalate; Lp-ox: Lactucopiricin-15-oxalate; DHLp: 11(S),13-dihydrolactucopiricin; Lp: Lactucopiricin. Lc-like: sum of all DHLC and Lc forms; dLc-like: sum of all DHdLc and dLc forms; Lp-like: sum of all DHLp and Lp forms; Total: sum of the 15 identified STLs.

3.5. Analysis of the total STLs content in edited plants regenerated from HR lines

A particularity of chicory hairy root lines is that they are able to regenerate spontaneous shoots. Thus, from the mutated hairy root lines we were able to regenerate whole plants that were

grown in a greenhouse for 3 months. Applying the previously described extraction method, 3-month-old edited chicory roots (n = 3 for each HR lines selected) were analyzed to evaluate the impact of the CRISPR/Cas9 mutation on STL accumulation. All the analyzed plants were derived from ChicBitter002 clone, with “Ctrl” corresponding to WT plants and “Ctrl_HR” corresponding to *R. rhizogenes*-infected chicory plants with no pYLCRISPR/Cas9P_{35S}-B or binary vector pYLCRISPR-GASshort or pYLCRISPR-GAO. Comparison of “Ctrl” and “Ctrl_HR” showed an increase in STL content for *R. rhizogenes*-infected plants (Fig. 5). For the rest of the analysis, the genome-edited chicory lines were compared to “Ctrl_HR”.

Seven edited-chicory lines were selected for their various mutation events (monoallelic or biallelic, one copy or several mutated copies). Determination of their STL content was carried out to represent the effect of each targeted gene on STL content. For the *CiGAS-short* form mutants, 5 lines have been selected: line HR3, a monoallelic mutant which carries a mutation in a single allele of *CiGAS-S1*; line HR2, a heterozygous biallelic mutant for *CiGAS-S1* where editing events induce a change in the coding frame; line HR9, a monoallelic mutant for both *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2*, meaning that only one allele is mutated in each of the two genes; line HR12, a heterozygous biallelic mutant for *CiGAS-S1* and a homozygous biallelic mutant for *CiGAS-S2*, meaning there is a change in the coding frame in both of these gene copies (Supplementary Fig. 5, Supplementary Fig. 6), and line HR12* which is the same as line HR12 except that there is an additional homozygous biallelic mutation for *CiGAS-S5* (Supplementary Fig. 5 to 7). For the *CiGAO* mutants, the 2 selected lines were: line HR16, a monoallelic mutant and line HR18, a heterozygous biallelic mutant with a change of the coding frame of its gene (Supplementary Fig. 8). The nucleotide sequences of these lines are described in Fig. 2. By comparing the total STL content of all these lines with the “Ctrl_HR”, only three lines showed significant reduction in STL content: HR12, HR12* and HR18. All three share biallelic mutations. All other *CiGAS-short* and *CiGAO* edited lines showed no significant difference in total STL content (Fig. 5). Most are monoallelic mutants, and one is a biallelic mutant only for one copy of the GAS gene (*CiGAS-S1*). Analysis of the STL content of a chicory edited for both alleles of *CiGAS-S2* with a change in the coding frame was also performed and showed no significant difference, but we did not have enough biological replicates to include this result in our data. Regarding the *CiGAS-short* form mutants, both the HR12 and HR12* edited line showed similar profiles where the total STL content was strongly reduced (Fig. 5). This trend was confirmed in total free forms and total oxalate forms of STLs (Supplementary Fig. 9). All these data suggest that the two copies (*S1* and *S2*) of *CiGAS-short* are important for STL production in our plants and must be simultaneously KO to significantly reduce the STL content. The *CiGAO* gene also plays an important role in STL production, but the impact was not as great as for the two copies of *CiGAS-short*.

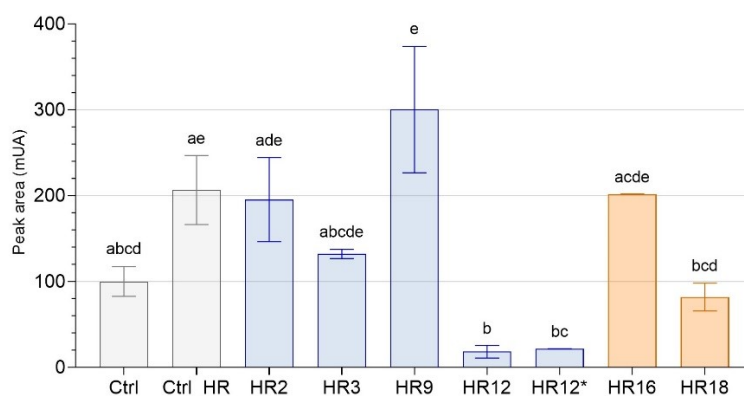


Figure 5. Total sesquiterpene lactone content of roots of edited chicory regenerated from HR lines by HPLC. The peak areas (mUA) of STLs in the roots of 7 genome edited chicory regenerated from HR lines were analyzed by HPLC and compared to WT chicory lines (Ctrl and Ctrl_HR). Gray bars correspond to control chicory lines, blue bars to *CiGAS-short* edited lines and orange bars to *CiGAO* mutants. The histogram shows the modulation of total STL content (sum of all identified STLs) as a function of mutation on chicory lines. HR12 and HR12* are originally the same hairy root line except that HR12 is mutated for only *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2* and HR12* is mutated for *CiGAS-S1*, *CiGAS-S2* and *CiGAS-S5*. Statistical analysis was performed using non-parametric one-way ANOVA and Dunn's post-hoc test ($p < 0.05$).

3.6. Sensory analysis

Sensory analysis was conducted on the root powder of thirteen field-grown chicory plants (R01 to R13). Each chicory was assigned a bitterness score from 0 to 10, and panelists determined that R09 and R06 were the most bitter chicories (score of 7.83 and 6.13, respectively) and R04 and R13 were perceived as the least bitter chicories (score of 2.21 and 2.49, respectively) (Fig. 6, Supplementary Table 3). First, a correlation between bitterness and each STL of the field-grown chicories was sought to assess whether a single or multiple compounds are involved in bitterness. Of the fifteen STLs identified in this paper, six were not correlated with bitterness: DHLc-gly, DHLc-ox, DHLc, Lc-ox, dLc-ox and, DHLp-ox (Supplementary Table 2). The remaining nine were more or less correlated with a Pearson's r ranging from 0.5587 to 0.9223 (Supplementary Table 2). Since bitterness cannot be attributed to a single compound, it is assumed that all STLs can be considered indicative of chicory bitterness. Next, the total STL content of each tasted chicory was assessed and a linear regression analysis was carried out to estimate whether the STL content can be correlated with the bitterness score (Fig. 6). A Pearson correlation allowed to establish a positive correlation ($R^2 = 0.46$) between the perception of bitterness and the total STL content of chicories, with $r = 0.68$ (two-tailed p -value = 0.0103). Finally, using the resulting linear regression equation, the seven hairy roots edited by CRISPR/Cas9 for *CiGAS-short* and *CiGAO* were assigned theoretical bitterness scores based on their STL content and in order to project the hairy root mutants onto the linear regression curve, it was artificially elongated. These data were plotted in Fig. 6. Based on its STL content and its theoretical bitterness score (5.06), the "Ctrl" sample would appear to be more bitter than most field-grown chicories, except for R06 and R09 (Fig. 6). The projection on the correlation curve of the sample

“Ctrl_HR”, which has a higher STL content than “Ctrl”, seems to indicate a high bitterness score (10.10). Therefore, the plant material generated by *R. rhizogenes* infection can initially be considered as very bitter. For the previously analyzed CRISPR/Cas9 edited-chicory lines, most of the theoretical bitterness scores obtained were in the range from 6.75 to 14.41, except the lines HR12, HR12* and HR18, which have theoretical bitterness scores of 1.29, 1.48 and 4.26, respectively (Fig. 6, Supplementary Table 3). The lines with the lowest theoretical scores are biallelic mutants for either *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2*, or *CiGAS-S1*, *CiGAS-S2* and *CiGAS-S5*, or *CiGAO*, and had low STL contents compared to the “Ctrl_HR” line. The other lines correspond to mutant lines whose STL content did not differ significantly from the “Ctrl_HR” line.

It can be concluded that a complete KO of *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2* genes could be sufficient to cause a drastic decrease in STL content that would be reflected in the bitterness score. HR12 and HR12* edited chicory lines almost lost their bitterness with a diminution of $86.35 \pm 0.9\%$ in their theoretical bitterness scores compared to “Ctrl_HR”. A full KO of the *CiGAO* gene is also responsible for a low bitterness score since it is 57.8% lower than the control “Ctrl_HR”.

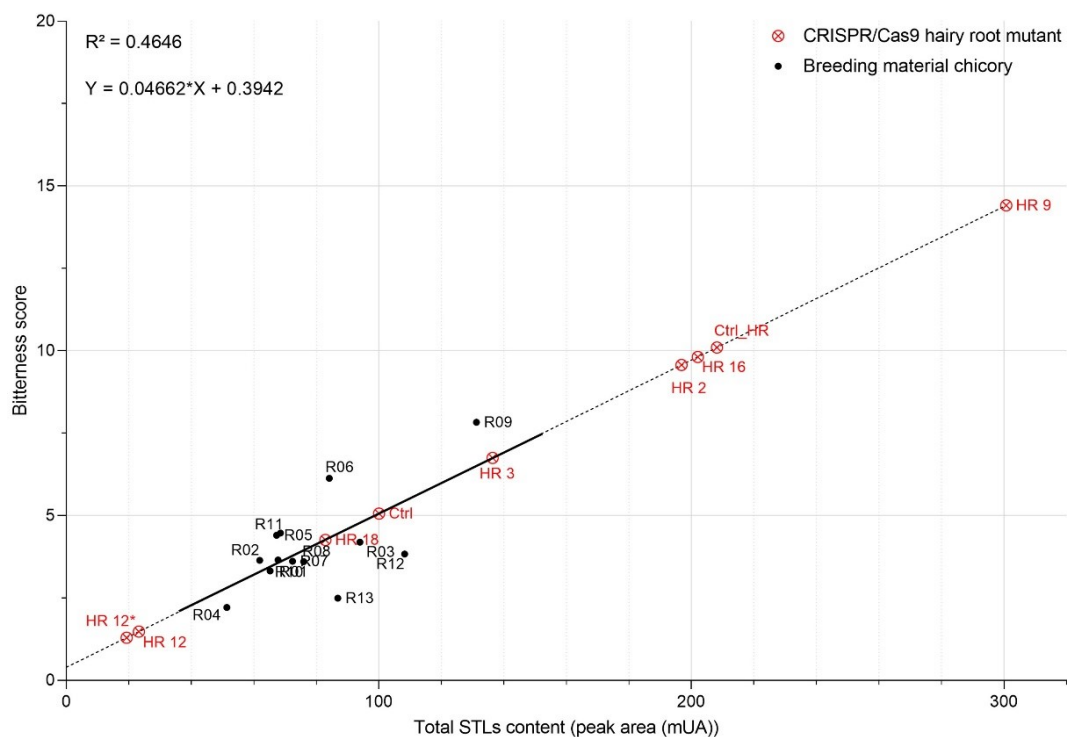


Figure 6. Relationship between the total STL content and the bitterness score of chicories. Positive correlation ($r = 0.68$) between these two parameters was established using thirteen field-grown chicories (in black). CRISPR/Cas9 hairy root mutants (in red) were projected onto the linear regression curve using the equation $Y = 0.04662 \cdot X - 0.3942$, where X was the total STL content of the samples. The significance of these results was confirmed by Pearson’s correlation test (two-tailed p -value = 0.0103).

4. Discussion

In this work, CRISPR/Cas9 system was successfully used to inactivate *CiGAS-S* and *CiGAO*. As a result, a reduction in STL content and hence presumed bitterness of chicory were obtained. In the past years, the CRISPR/Cas9 system has been already applied in *C. intybus* to abolish functions of numerous genes. The transformation methods used were either *R. rhizogenes* infection or protoplast transfection, both techniques having advantages and disadvantages [21,25-29]. In this work, *R. rhizogenes*-mediated CRISPR/Cas9 editing was used for its efficiency (mutation frequency of 26 %, calculated by the sum of mutant hairy root lines over the sum of total hairy root lines with binary vector), for its ability to generate a large amount of biological material and for the particularity of ChicBitter002 chicory HRs to spontaneously regenerate shoots as described in literature [41, 42]. HR-derived plants have a slightly modified chicory phenotype and can flower early without vernalization as it is required for WT plants [29]. The presence of T-DNA of *R. rhizogenes* also seems to activate the production of specialized metabolites as previously observed [43-45]. Indeed, an increase in STL content was observed in "Ctrl_HR" plants when compared to "Ctrl" plants (Fig. 5) and most of the HR mutant lines contained the same amounts of total STLs. However a significant decrease in total STL content was observed when biallelic mutants were obtained (HR12, HR12* and HR18). It is the case of the HR12 line, a biallelic mutant for both *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2*, who has a significant decrease in total STL content. This differs from the results obtained by Cankar et al [28] where a decrease in STL content was only possible when all six alleles of *CiGAS-short S1* to *S3*, or all eight alleles of *CiGAS-short* form and *CiGAS-long* form were mutated. In addition, the HR12* line also showed a drastic decrease in total STL content. This line also has a biallelic mutation on both *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2* but an additional mutation was observed on *CiGAS-S5*. However, no difference was observed between the total STL content of HR12 and HR12*. The explanation for this result could be that 1) the copy *CiGAS-S5* was expressed at low in our growing conditions or in the root tissue, not compensating for the inhibition of *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2*, or was not expressed ; or 2) the level of STLs in these HR lines was already very low and the effect of the mutation on *CiGAS-S5* cannot be seen. To discriminate between these hypotheses, it could be considered to analyze the STL content of plants mutated only for *CiGAS-S5* or, on the contrary, mutated for all *CiGAS-short* form except *CiGAS-S5*, or to realize qPCR in order to determine the expression levels of this copy but this could be difficult because the different copies of *CiGAS-short* share high sequence identity. A decrease was also observed for biallelic mutant for *CiGAO* (line HR18), but the impact was not as important as the decrease caused by the biallelic mutation of *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2*. Indeed, contrary to our expectations the production of STLs for HR18 line was not completely inhibited but only reduced by 60.1% compared to "Ctrl_HR". This is the

first time that the effect on STL production was described when *CiGAO* is mutated. The only partial reduction in STL content may suggest that other gene confers the ability to initiate STL synthesis, such as unidentified GAO-like genes or CYP71AV member genes that may perform the same function as GAO. In the literature, several expressed copies of *CiGAO* have been identified in *C. endivia* and only one functional gene has been described for *CiGAO* in *C. intybus* [17, 46, 47]. Given the existence of gene clusters for the *CiGAS-S* and *CiKLS* genes involved in the STL biosynthetic pathway, the hypothesis that multiple active copies of *CiGAO* would exist seems more than likely. However, it should be considered that *CiGAO* is a gene belonging to the large family of cytochromes P450, especially the CYP71AV subfamily [17, 48]. It has been shown that members of this subfamily can catalyze the conversion of several sesquiterpenes such as the valencene oxidase (CYP71AV8) which is able to convert germacrene A to its acid *in vitro* [18] or the CYP71AV9, a GAO gene identified in *Cynara cardunculus*, which is capable of partially converting (+)-germacrene D, cascarilladiene and amorpho-4,11-diene to their oxidized products [49]. Since many genes belong to this family, it is possible that some of them take over when *CiGAO* is inhibited. Taking these arguments into account, we can also hypothesize that if the *CiGAS-S1* and *CiGAS-S2* gene mutations have a greater impact on STLs content than the *CiGAO* gene mutation, this may be due to the fact that the *CiGAS* genes are terpene synthases that appear to have greater substrate specificity than cytochrome P450. Therefore, it can be assumed that even if other terpene synthases are present in the genome, they do not appear to compensate for the loss of several copies of *CiGAS-short*, resulting in greater inhibition of STLs synthesis.

In this work, additional information on the players in the STL biosynthetic pathway have also been provided. Bogdanovic et al [16] had previously described the genomic organization of the *CiGAS* genes with the identification of four copies of *CiGAS-short* form and a single gene for *CiGAS-long* form. The analysis of the industrial chicory ChicBitter002 genome carried out in this work enabled the identification of an additional copy named *CiGAS-S5*. However, the action of this newly identified gene copy on root STL content could not be confirmed in *C. intybus*. Over the last ten years, it has been shown that genes involved in the same biosynthetic pathway are sometimes colocalized in one region of the genome in several plants [50]. This gene clustering may cover a complete or near-complete biosynthetic pathway, or it may only be partial, involving a cluster of 2 or 3 genes encoding enzymes from 2 or 3 consecutive steps in a biosynthetic pathway [51]. For the biosynthetic pathway of STLs, it has been previously published that *CiGAS-S1*, *CiGAS-S2* and *CiGAS-S3* were mapped on the same linkage group (LG3), confirming an initial localization of one *CiGAS-short* form gene in the genetic reference map for chicory [16, 52]. In our case, we found the same data with the first three copies of *CiGAS-short* form colocalized with *CiGAO* on the same contig (Supplementary Fig. 3). Therefore, we physically established the colocalization of 3 active copies of *CiGAS-short* form genes and one active

copy of the *CiGAO* gene, two genes involved in the consecutive enzymatic transformation of FPP into germacrene A for the first step and to germacrene A to germacrene A acid for the second step. Moreover, preliminary Blastp alignments of our *CiGAS-S5* sequence to the nr database (Asterid section) under the NCBI site have indicated one candidate sequence (Protein_id=KAI3765470.1) from the *C. intybus* genome of Fan *et al* [53], which is different from the sequence revealed with 3 *CiCSAS-S1*, *S2* and *S3* as entries (Protein_id=KAI3781194.1). According to the NCBI database information, both sequences are on separate linkage group localizations, LG3 and LG2 for KAI3765470.1 and KAI3781194.1, respectively. Further, KAI3765470.1 (supposed *CiGAS-S5* locus) is located to 60.1kb of a region with two predicted sequences (KAI3765465.1 and KAI3765466.1) with strong sequence homologies with our *CiGAS-S4b*, including the interruption in the exon 3 (data not shown). Overall, there is some evidence that *CiGAS-S5/CiGAS-S4b*, which were on a separate contig from the 3 *CiGAS-S1* to *CiGAS-S3* copies according to our data, are actually on different chicory chromosomes.

With the goal of using chicory as a functional ingredient, bitterness modulation represents a great importance for manufacturers and STLs are known to contribute predominantly to this bitterness in *C. intybus* [8-10]. In our work, the determination of the STL content was performed using an extraction mimicking food consumption condition and we considered that the total STL content was a good marker to assess bitterness, as confirmed by the correlation established in our sensory analysis. In fact, studies combining sensory analysis and identification of the most bitter compound are not always in agreement: on the one hand, Price *et al* [8] consider lactucin glycoside to be the most bitter STL, while on the other hand, Van Beek *et al* [10] states that 11(S),13-dihydrolactucopicrin is the most bitter due to its very low perception threshold. Furthermore, the various studies conducted on the characterization of STLs do not establish that a particular abundance of any form of STLs can influence the perception of bitterness. For example, Ferioli *et al* [54] reported that glycosylated STLs were the most abundant forms in chicory, accounting for an average of 60% of the total STL content, and Graziani *et al* [14] claimed that oxalated forms were the least abundant STLs in chicory, with the concentration of 11(S),13-dihydrolactucopicrin-15-oxalate accounting for about 0.2 to 2% of the total content of STLs. These data were contradicted by Kips [55] who reported that oxalate forms were the most abundant STLs in chicory, which was confirmed by Bogdanovic *et al* [29] and Twaragowska *et al* [56] who found a two-to-four-fold higher oxalate content than the other STLs, apart for 11(S),13-dihydrolactucin and 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin. In the end, there is no consortium on the most bitter compound, but it is accepted that all STLs contribute strongly to bitterness. These inconsistencies may be due to various reasons such as cultivar, growing conditions and techniques, storage conditions and duration, or the method of drying or extraction of the chicory root. In addition, in most papers, chicory root extracts are hydrolyzed or undergo enzymatic treatment to release the bound forms of

STL and allow the evaluation of a total content that better correlates with sensory bitterness as the STL content pool is closer to what the consumer perceives when chicory products are consumed [16, 46, 57, 58].

In addition of their involvement in bitterness, STLs play a role in plant defense such as antibacterial or antifungal activities. The lettukenin A, a STL of lettuce, has been shown to have antimicrobial activity against *Bremia lactucae*, *Botrytis cinerae* and *Pseudomonas syringae* phytopathogens [59] and the study of Wedge *et al* [60] showed the antifungal activity of 6 STLs against *Colletotrichum acutatum*, *Phytophthora fragariae*, *Phomopsis* sp. and *B. cinerae* phytopathogens. To date, no study has tested the antimicrobial activity of chicory root extracts against phytopathogens but only against human pathogenic strains. However the presence of hydroxycinnamic acids, in particular chlorogenic acid and isochlorogenic acid, in large quantities in chicory roots do not allow to conclude the involvement of STLs [61-63]. STLs are also known for their antiparasitic activities [64], and for this purpose, chicory is used as a forage plant. Since these chicories require high levels of STLs, CRISPR/Cas9 could also be used not to reduce bitterness but rather to increase the levels of STLs, perhaps by acting directly on transcription factors.

5. Conclusion

Interest in using *C. intybus* as a functional ingredient has increased in the last few years and chicory flour has recently been shown to have multiple health benefits [5, 6]. Many articles have focused on the use of chicory root as a functional ingredient in food products such as yogurts and biscuits but also as chicory flour to be added to crackers, cakes and bread [7, 65-70]. However, the amount of chicory used in these products never exceeds 5% because its bitterness causes a rejection by consumers. Several debittering methods have been investigated in chicory over the past years. For example, a change in the growing conditions can be responsible for a less bitter chicory taproot, chicory roots can be bleached or soaked into water for several hours, or low bitter taproot chicories can be bred by classical breeding approach [56, 71, 72]. However genetic engineering can also be used in chicory to reduce STL content in *Cichorium intybus* L. CRISPR/Cas9 is a useful tool for elucidating gene function that has been used to help breeding and to improve crops such as maize, rice, or wheat [23, 73-76]. In this work, we successfully used the CRISPR/Cas9 system to inactivate *CiGAS-short* form and *CiGAO* genes resulting of a reduction in the STLs content. Given the limitations of current European legislation on the use of CRISPR/Cas9-modified plants, it was not possible to perform a sensory analysis and establish a direct link between bitterness and the amount of STLs in HR chicory lines. Therefore,

an indirect link was established by performing sensory analysis of thirteen field-grown chicories, which allowed us to define a bitterness scale based on STLs content and to establish a theoretical bitterness score for the HR mutant lines. We identified three HR mutant lines with significantly reduced STLs content: the HR12 and HR12* lines, that have a theoretical bitterness score between 1 and 2 meaning that bitterness is almost no more perceived, and the HR18 line which has a bitterness score decreased by 57.8% compared to the “Ctrl_HR” which is much more bitter than industrial chicories grown in fields because of the integration of T-DNA in ChicBitter002. Using the CRISPR/Cas9 tool, we were able to modulate the bitterness of *C. intybus* and identify the genes responsible for this. To our knowledge, this is the first time that the effect of CRISPR/Cas9 edited chicory on bitterness can be assessed, even indirectly. The new CRISPR/Cas9-based biotechnology has proven once again to be more efficient and accurate, less energetic and less expensive in time than the other techniques of debittering. As plants obtained by using CRISPR/Cas9 technology are considered to be genetic modified organisms by the current European legislation they cannot be used directly but will provide useful data to breeders to develop and propose less bitter varieties of chicory by molecular marker-assisted breeding. The mutants are also an excellent research material to study the biological activities of STLs.

Abbreviations

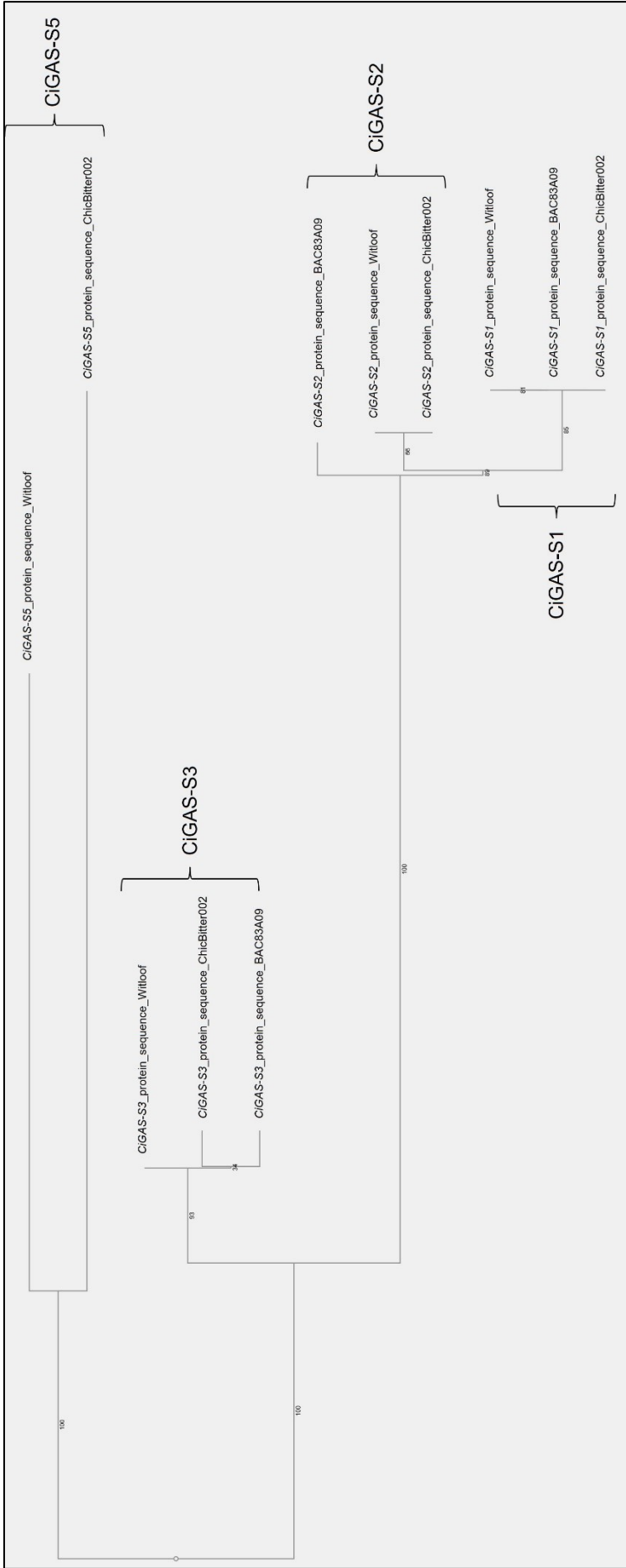
COS, costunolide synthase; FPP, farnesyl-pyrophosphate; GAO, germacrene A oxidase; GAS, germacrene A synthase; HR, hairy root; KLS, kauniolide synthase; KO, knockout; LG, linkage group; sgRNA, single-guide RNA; STL, sesquiterpene lactone; WT, wild-type

6. Supplementary Material

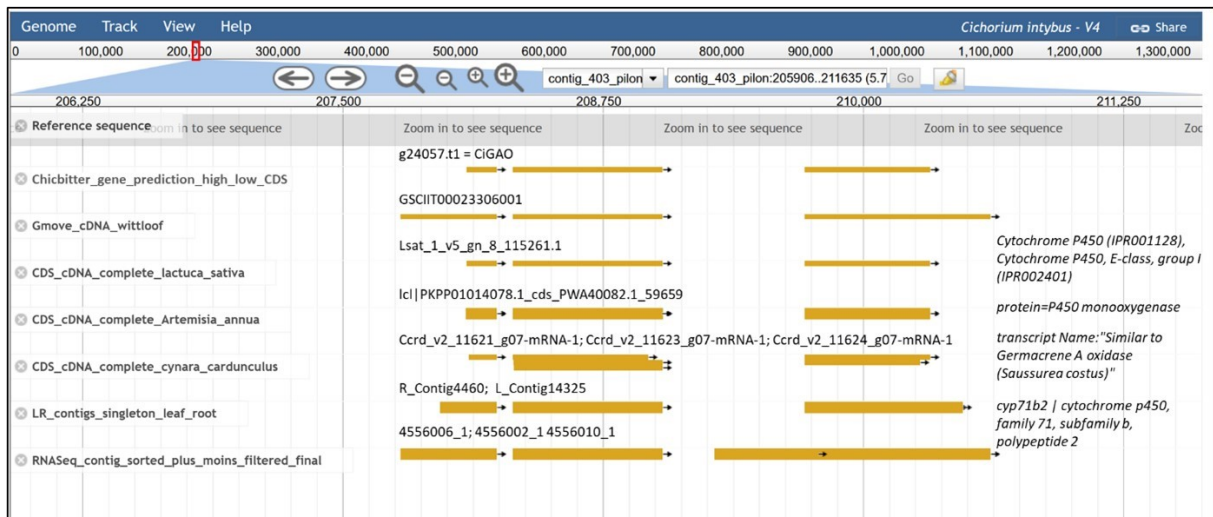
Supplementary Table 1. List of oligonucleotides.

| Name | Sens | 5'-3' sequence |
|----------|---------|---|
| CiGAS_T1 | Forward | ATCGGT GTAGTAAACACTCTCGA |
| | Reverse | AAACTC GAGAGTGTTTACTACAC |
| CiGAS_T2 | Forward | ATCGAACC ATTGGCATCCCCTGA |
| | Reverse | AAACTC AGGGGATGCCAATGGTT |
| CiGAO_T1 | Forward | ATCGTT GTTGGATTTGGGACGAG |
| | Reverse | AAACCT CGTCCCAAATCCAACAA |
| CiGAO_T2 | Forward | ATCGGAGT CGCGATGCCTCTGGA |
| | Reverse | AAACTC CAGAGGCATCGCGACTC |
| GG1-F | Forward | ATATATGGTCTCACTCGAAAGAACCAACCTGTTTTCATAGC |
| GG1-R | Reverse | ATTATTGGTCTCAACCTAAAAAAGCACCGACTCGGTG |
| GG2-F | Forward | ATATATGGTCTCAAGGTAAAGAACCAACCTGTTTTCATAGC |
| GG2-R | Reverse | ATTATTGGTCTCAACCGAAAAAAGCACCGACTCGGTG |
| RoIB | Forward | TGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA |
| | Reverse | TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC |
| C9-F | Forward | AAGCACGTTGCTCAGATCCT |
| C9-R | Reverse | CCGTTTCGTCTCGATAAGAGG |
| S1 | Forward | AGAATCTATTAATCGGCTTT |
| | Reverse | [HEX] TAAGGATCATCGCTTAATTA |
| S2 | Forward | [HEX] CCCAGAATCTATTAATTGGT |
| | Reverse | AAGTTAGGTTATTTCCGTTG |
| S3 | Forward | [6-FAM] AATGATTACTCCGGTTTAGT |
| | Reverse | TTCCGATTTCTTAATACTGA |
| S5 | Forward | [6-FAM] GTTCTCGTGCATTATACTTG |
| | Reverse | ACCTTCCCCTATGTATGTAT |
| GAO | Forward | [HEX] TCACTACTTCCATTGCTCT |
| | Reverse | ACTCTCTTTGATCCTTGATT |

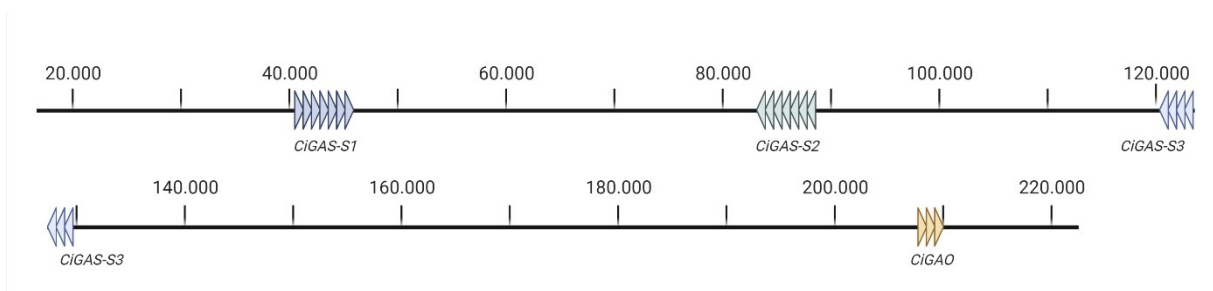
Binding sites used to insert sgRNA into the intermediate plasmid are in bold. [6-FAM] and [HEX] are fluorescent dyes used to label primers at the 5' extremity.



Supplementary Figure 1. Phylogenetic tree of CiGAS-short genes obtained by MAFFT protein alignment. The alignment was performed between the four expressed copies of CiGAS-short genes identified in the wiltloof chicory genome (protein_sequence_Wiltloof), in the ChicBitter002 chicory genome (protein_sequence_ChicBitter002) and in the BAC clones published by Bogandovic *et al.* [16] (protein_sequence_BAC83A09).



Supplementary Figure 2. Jbrowse visualization of the 3 exons-structured *CiGAO* gene. The predicted (g24057.t1= *CiGAO* gene) is aligned against the ChicBitter002 reference sequence in the first track. The second track is the predicted witloof gene sequence from the CARGESE program. The 3 following tracks are putative orthologues from related Asteraceae species. The 2 last tracks are transcripts sequences issued from RNA-seq data (Qualichic, CARGESE programs) thus confirming the expression of the gene. Sequence IDs are indicated on the top of each track. Annotation information is given on the right of the tracks.



Supplementary Figure 3. Schematic representation of the genomic organization of the contig_403_pilon. Genes *CiGAS-S1*, *CiGAS-S2*, *CiGAS-S3* and *CiGAO* are colocalized in the chicory genome. Each exon is represented by an arrow. The orientation of the arrows indicates the direction of transcription.

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|
| 1: <i>CiGAS-S1</i> | 100.00 | 97.97 | 89.33 | 86.40 |
| 2: <i>CiGAS-S2</i> | 97.97 | 100.00 | 88.97 | 86.11 |
| 3: <i>CiGAS-S3</i> | 89.33 | 88.97 | 100.00 | 93.51 |
| 4: <i>CiGAS-S5</i> | 86.40 | 86.11 | 93.51 | 100.00 |

Supplementary Figure 4. Percentage of identity matrices found in the sequence comparisons between coding regions of *CiGAS-short*.

Supplementary Table 2. Correlation between individual STL and bitter score.

| STL | R ² | Pearson's r | p-value | Significant? |
|-----------|----------------|-------------|---------|--------------|
| DHLc-gly | 0.01648 | 0.1284 | 0.6759 | No |
| DHLc-ox | 0.1633 | 0.4041 | 0.1709 | No |
| DHLc | 0.1107 | 0.3327 | 0.2666 | No |
| Lc-ox | 0.03821 | 0.1955 | 0.5222 | No |
| Lc | 0.3121 | 0.5587 | 0.0472 | Yes |
| dLc-gly | 0.8506 | 0.9223 | <0.0001 | Yes |
| dLc-ox | 0.1665 | 0.4080 | 0.1663 | No |
| dLc | 0.5723 | 0.7565 | 0.0028 | Yes |
| DHdLc-gly | 0.448 | 0.669 | 0.0122 | Yes |
| DHdLc-ox | 0.4171 | 0.6458 | 0.0171 | Yes |
| DHdLc | 0.5728 | 0.7568 | 0.0027 | Yes |
| DHLp-ox | 0.1603 | 0.4004 | 0.1851 | No |
| DHLp | 0.6668 | 0.8166 | 0.0007 | Yes |
| Lp-ox | 0.3745 | 0.6120 | 0.0262 | Yes |
| Lp | 0.5779 | 0.7602 | 0.0026 | Yes |

Linear regression and Pearson's correlation test was performed between the bitter score and individual STL of the thirteen field-grown chicories used for sensorial analysis. DHLc-gly: 11(S),13-dihydrolactucin-15-glycoside; DHLc-ox: 11(S),13-dihydrolactucin-15-oxalate; DHLc: 11(S),13-dihydrolactucin; Lc-ox: Lactucin-15-oxalate; Lc: Lactucin ; dLc-gly: 8-deoxylactucin-15-glycoside; dLc-ox: 8-deoxylactucin-15-oxalate; dLc: 8-deoxylactucin; DHdLc-gly: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin-glycoside; DHdLc-ox: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin-15-oxalate; DHdLc: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin; DHLp-ox: 11(S),13-dihydrolactucopicrin-15-oxalate; DHLp: 11(S),13-dihydrolactucopicrin; Lp-ox: Lactucopicrin-15-oxalate; Lp: Lactucopicrin

Supplementary Table 3. Relationship between total STL content and bitterness score.

| A | Samples | Total STL content (peak area (mUA)) | Bitterness score |
|---|------------|---|---------------------|
| | R01 | 67.77 | 3.65 |
| | R02 | 61.90 | 3.64 |
| | R03 | 93.95 | 4.19 |
| | R04 | 51.40 | 2.21 |
| | R05 | 67.28 | 4.4 |
| | R06 | 84.16 | 6.13 |
| | R07 | 72.39 | 3.61 |
| | R08 | 75.95 | 3.6 |
| | R09 | 131.23 | 7.83 |
| | R10 | 65.20 | 3.32 |
| | R11 | 68.57 | 4.47 |
| | R12 | 108.28 | 3.83 |
| | R13 | 86.86 | 2.49 |

| B | Samples | Total STL content (peak area (mUA)) | Bitterness score |
|---|----------------|---|---------------------|
| | Ctrl_HR | 208.20 | <i>10.10</i> |
| | HR18 | 82.88 | <i>4.26</i> |
| | HR16 | 202.04 | <i>9.81</i> |
| | HR3 | 136.4 | <i>6.75</i> |
| | HR9 | 300.73 | <i>14.41</i> |
| | HR2 | 196.83 | <i>9.57</i> |
| | HR12 | 19.31 | <i>1.29</i> |
| | HR12* | 23.24 | <i>1.48</i> |
| | Ctrl | 100.08 | <i>5.06</i> |

Panel A) represents data for the 10 field-grown chicories analyzed by sensory analysis. Panel B) represents data for the controls and the CRISPR/Cas9 hairy root mutants. Data in italic represent theoretical bitterness score calculated with the equation $Y = 0.06366 * X - 0.6515$ obtained by linear regression analysis. Total STL content (X) of each CRISPR/Cas9 HR lines samples were estimated by HPLC and sum of the STL peaks.

| | | | | | | | |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | | | 20 | | 40 | | 60 |
| CiGAS-S1 (WT) | MAAVEANGTF | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | MAAVEANGTF | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | MAAVEANGTF | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | MAAVEANGTF | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | MAAVEANGTF | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| | | | 80 | | 100 | | 120 |
| CiGAS-S1 (WT) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| | | | 140 | | 160 | | 180 |
| CiGAS-S1 (WT) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | DSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | DSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | DSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | DSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | DSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| | | | 200 | | 220 | | 240 |
| CiGAS-S1 (WT) | FTETQLKSVV | NTLEGNLAKQ | VMQSLRRPFH | QGMPMVEARM | YFSNYDEECS | THESLPKLAK | 240 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | FTETQLKSVV | NTLEGNLAKQ | VMQSLRRPFH | HGDANG* | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | FTETQLKSVV | NRGCQWLRQG | CISPTMMKNV | PHTSHYLSLQ | SFISTICSYN | KRKNFALSQS | 240 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | FTETQLKSVV | NTLEGNLAKQ | VMQSLRRPFH | HGDANG* | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | FTETQLKSVV | NRGCQWLRQG | CISPTMMKNV | PHTSHYLSLQ | SFISTICSYN | KRKNFALSQS | 240 |
| | | | 260 | | 280 | | 300 |
| CiGAS-S1 (WT) | LHFNYLQLQQ | KEELRIVSKW | WKDMRFQETT | PYIRDVRPEI | YLWILGLYFE | PRYSLARIIA | 300 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | GGR I* | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | GGR I* | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| | | | 320 | | 340 | | 360 |
| CiGAS-S1 (WT) | TKITLFLVVL | DDTYDAYATI | EEIRLLTDAI | NRWDISAMEQ | IPEYIRPFYK | ILLDEYAELE | 360 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| | | | 380 | | 400 | | 420 |
| CiGAS-S1 (WT) | KQLAKEGRAK | SVIASKEAFQ | DIARGYLEEA | EWTNSGYVAS | FPEYMKNGLI | TSAYNVISKS | 420 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| | | | 440 | | 460 | | 480 |
| CiGAS-S1 (WT) | ALVGMGEMVG | EDALAWYESH | PKTLQASELI | SRLQDDVMTY | QFERERGGSA | TGVDSYIKTY | 480 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| | | | 500 | | 520 | | 540 |
| CiGAS-S1 (WT) | GVTEKEAIDE | LNKMIENAWK | DINEGCLKPR | EVSMDLLAPI | LNLARMIDVV | YRYDDGFTFP | 540 |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 245 |
| | | | | | | | |
| CiGAS-S1 (WT) | GKTMKEYITL | LFVGSSPM* | 559 | | | | |
| CiGAS-S1 (HR12.1) | ----- | ----- | 217 | | | | |
| CiGAS-S1 (HR12.2) | ----- | ----- | 245 | | | | |
| CiGAS-S1 (HR12*.1) | ----- | ----- | 217 | | | | |
| CiGAS-S1 (HR12*.2) | ----- | ----- | 245 | | | | |

Supplementary Figure 5. Protein sequence of the copy *CiGAS-S1* of mutant HR lines. Sequences of WT *CiGAS-S1* were aligned against the two mutated alleles of HR12 and HR12* lines. For both HR12 and HR12*, allele 1 have an insertion of a T and allele 2 have a deletion of 58 nucleotides in their exon 3. Both resulting in a change in the coding frame and appearance of stop codons. Stop codons were highlighted in pink.

| | | | | | | | |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | | | 20 | | 40 | | 60 |
| CiGAS-S2 | MAAVEANGTL | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTKELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | MAAVEANGTL | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTKELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | MAAVEANGTL | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTKELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | MAAVEANGTL | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTKELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | MAAVEANGTL | QANTKTTEPV | RPLANFPPSV | WGDRFLSFSL | DTKELEGYAK | AMEEPKEEVR | 60 |
| | | | 80 | | 100 | | 120 |
| CiGAS-S2 | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | KLIVDPTMDS | NKKLSLIYSV | HRLGLTYLFL | QEIEAQLDKL | FKEFNLQDYD | EFDLYTTSIN | 120 |
| | | | 140 | | 160 | | 180 |
| CiGAS-S2 | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | NSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | NSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | NSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | NSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | FQVFRHLGHK | LPCDVFNFKF | NSSSGTFKES | ITNDVKGMLG | LYESAQLRLR | GEPILDEASA | 180 |
| | | | 200 | | 220 | | 240 |
| CiGAS-S2 | FTETQLKSVV | NTLEGNLAKQ | VMQSLRRPFH | QGMPMVEARM | YFSNYDEECS | THESLLKLAK | 240 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | FTETQLKSVV | NTLEGNLAKQ | VMQSLRRPFH | QGDANG* | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | FTETQLKSVV | NTLEGNLAKQ | VMQSLRRPFH | QGDANG* | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | FTETQLKSVV | NTLEGNLAKQ | VMQSLRRPFH | QGDANG* | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | FTETQLKSVV | NTLEGNLAKQ | VMQSLRRPFH | QGDANG* | ----- | ----- | 217 |
| | | | 260 | | 280 | | 300 |
| CiGAS-S2 | LHFNYLQLQQ | KEELRIVSKW | WKDMRFQETT | PYIRDVRPEI | YLWILGLYFE | PRYSLARIIA | 300 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| | | | 320 | | 340 | | 360 |
| CiGAS-S2 | TKITLFLVVL | DDTYDAYATI | EEIRLLTDAI | NRWDISAMEQ | IPEYIRPFYK | ILLDEYAELE | 360 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| | | | 380 | | 400 | | 420 |
| CiGAS-S2 | KQLAKEGRAK | SVIASKEAFQ | DIARGYLEEA | EWTNSGYVAS | FPEYMKNGLI | TSAYNVISKS | 420 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| | | | 440 | | 460 | | 480 |
| CiGAS-S2 | ALVGMGEMVS | EDALAWYESH | PKTLQASELI | SRLQDDVMTY | QFERERQGSA | TGVDSYIKTY | 480 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| | | | 500 | | 520 | | 540 |
| CiGAS-S2 | GVTEKEAIDE | LNKMIENAWK | DINEGCLKPR | EVSMDLLAPI | LNLARMIDVV | YRYDDGFTFP | 540 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| | | | 559 | | | | |
| CiGAS-S2 | GKTMKEYITL | LFVGTSPM* | | | | | 559 |
| CiGAS-S2 (HR12.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |
| CiGAS-S2 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 217 |

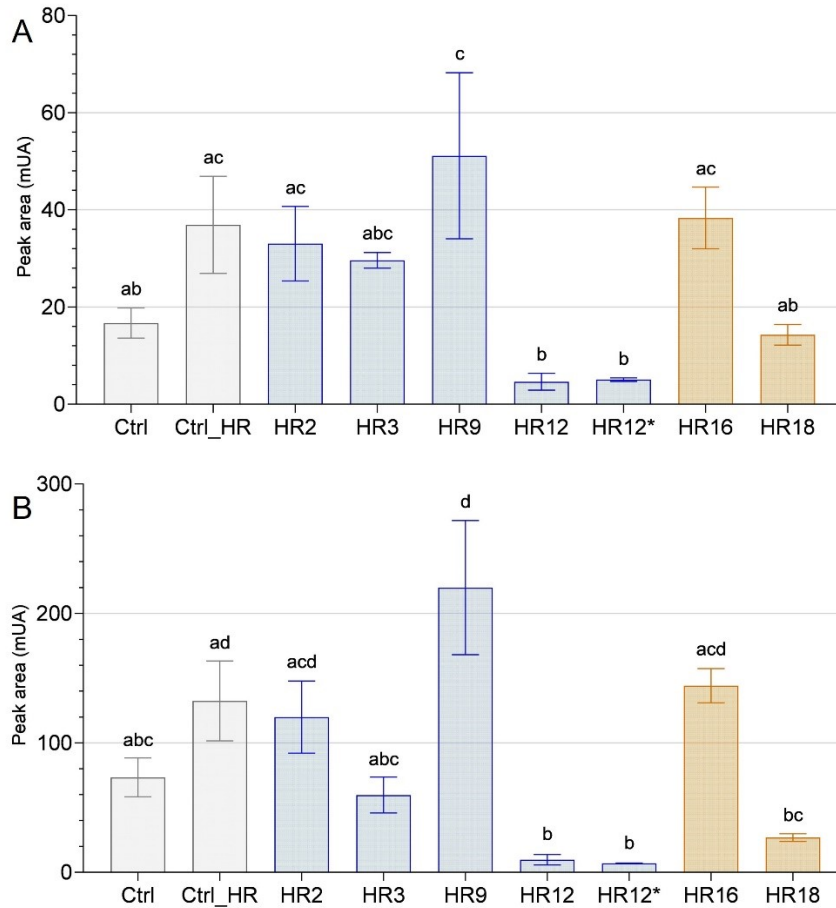
Supplementary Figure 6. Protein sequence of the copy *CiGAS-S2* of mutant HR lines. Sequences of WT *CiGAS-S2* were aligned against the two mutated alleles of HR12 and HR12* line. For both HR12 and HR12*, allele 1 and allele 2 have an insertion of an A in their exon 3. Both resulting in a change in the coding frame and appearance of stop codons. Stop codons were highlighted in ink.

| | | | | | | | |
|--------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| | | | 20 | | 40 | | 60 |
| CiGAS-S5 | MAAVKTNATM | TTIQAKTNTT | AEQVRPLARF | PPSRWGDRFL | SFTLDNSELE | GYARAMEEPK | 60 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | MAAVKTNATM | TTIQAKTNTT | AEQVRPLARF | PPSRWGDRFL | SFTLDNSELE | GYARAMEEPK | 60 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | MAAVKTNATM | TTIQAKTNTT | AEQVRPLARF | PPSRWGDRFL | SFTLDNSELE | GYARAMEEPK | 60 |
| | | | 80 | | 100 | | 120 |
| CiGAS-S5 | EDLRRLLITDA | TMESNKKLSL | IYSVHRLGLT | YLFLQEIEAQ | LDKLFEEFNL | QDYADLDLYT | 120 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | EDLRRLLITDA | TMESNKKLSL | IYSVHRLGLT | YLFLQEIEAQ | LDKLFEEFNL | QDYADLDLYT | 120 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | EDLRRLLITDA | TMESNKKLSL | IYSVHRLGLT | YLFLQEIEAQ | LDKLFEEFNL | QDYADLDLYT | 120 |
| | | | 140 | | 160 | | 180 |
| CiGAS-S5 | LSINFQVFRH | LGYKLPDVF | NKIKDSSSGA | FKEGIATDVK | GMLGLYECAQ | LSVRGESILD | 180 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | LSINFQVFRH | LGYKLPDVF | NKIKDSSSGA | FKEGIATDVK | GMLGLYECAQ | LSVRGESILD | 180 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | LSINFQVFRH | LGYKLPDVF | NKIKDSSSGA | FKEGIATDVK | GMLGLYECAQ | LSVRGESILD | 180 |
| | | | 200 | | 220 | | 240 |
| CiGAS-S5 | EAAAFTEAKL | KSVVNTLEGN | LAKQVIQSLR | RPFHGMTLV | EAMLYFSNYD | EDCSKHKSL | 240 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | EAAAFTEAKL | KSVVNTLRR* | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | EAAAFTEAKL | KSVVNTLRR* | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| | | | 260 | | 280 | | 300 |
| CiGAS-S5 | KLAKLHFNYL | ELQQKEELRI | VSKWVKDMRF | QETTPYIRD | VPETYLWILG | LYFEPYRSLA | 300 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| | | | 320 | | 340 | | 360 |
| CiGAS-S5 | RIIATKIALF | LVVLDPTYDA | YATIEEIRLL | TDAINRWDM | AMEQIPEYIR | PFYKILLDEY | 360 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| | | | 380 | | 400 | | 420 |
| CiGAS-S5 | AELEKQLAIE | GRANIVIASK | EAFQDIARGY | LEEAEWTSNG | YVASFPEYMK | NGLITSAVNF | 420 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| | | | 440 | | 460 | | 480 |
| CiGAS-S5 | FFKSALVGMG | EIISENELAW | YKSHPKTLQA | PELITRLQDD | VMTYQFERER | GQSATSVDAY | 480 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| | | | 500 | | 520 | | 540 |
| CiGAS-S5 | IKTYGVSEKE | AIYELKIMIE | NAWKDINEGC | LKPREVSMDL | LAPILNVARM | IDVFYRYDDG | 540 |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 200 |
| | | | 560 | | | | |
| CiGAS-S5 | FTFPGKTMKE | YITLLFVGSV | SM* | 563 | | | |
| CiGAS-S5 (HR12*.1) | ----- | ----- | --- | 200 | | | |
| CiGAS-S5 (HR12*.2) | ----- | ----- | --- | 200 | | | |

Supplementary Figure 7. Protein sequence of the copy *CiGAS-S5* of mutant HR12* line. Sequences of WT *CiGAS-S5* was aligned against the two mutated alleles of HR12* line. Allele 1 (HR12*.1) and allele 2 (HR12*.2) have an insertion of an A in their exon 3. Both resulting in a change in the coding frame and appearance of stop codons. Stop codons were highlighted in pink.

| | | | | | | | |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|-------------|---------------|--------------|-----|
| | | 20 | | 40 | | 60 | |
| Protein_GAO | MELSLTTSIA | LATIVLILYK | LATRPKSNKK | RLPEASRLPI | IGHMHLIGT | MPHRGVMELA | 60 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | MELSLTTSIA | LATIVLILYK | LATQSQIQQK | APSRGIATPN | NRSHASSHRY | NATSWCYGIS | 60 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | MELSLTTSIA | LATIVLILYK | LATHPTKSAF | QRHRDSQ* | ----- | ----- | 38 |
| | | 80 | | 100 | | 120 | |
| Protein_GAO | RKHGSLMHLQ | LGEVSTIVVS | SPKWAKEILT | TYDITFANRP | ETLTGEI IAY | HNTDIVLAPY | 120 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | QKAWIFDAST | AW* | ----- | ----- | ----- | ----- | 73 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 38 |
| | | 140 | | 160 | | 180 | |
| Protein_GAO | GEYWRQLRKL | CTLELLSVKK | VKSFQSIREE | ECWNLVKEVK | ESGSGKPI SL | SESI FKM IAT | 180 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 73 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 38 |
| | | 200 | | 220 | | 240 | |
| Protein_GAO | ILSRAAFGKG | IKDQREFTEI | VKEILRQTGG | FDVADIFPSK | KFLHHLGSKR | ARLTSIHKKL | 240 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 73 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 38 |
| | | 260 | | 280 | | 300 | |
| Protein_GAO | DTL INNIVAE | HHVSTSSKAN | ETLLDVLLRL | KDSAEFPLTA | DNVKA I I LDM | FGAGTDTSSA | 300 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 73 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 38 |
| | | 320 | | 340 | | 360 | |
| Protein_GAO | TVEWA I SEL I | RCPRAMEKVQ | AELRQALNGK | EKIQEEDIQD | LPYLNLVIRE | TLRLHPPLPL | 360 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 73 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 38 |
| | | 380 | | 400 | | 420 | |
| Protein_GAO | VMPRECREPV | NLAGYE I ANK | TKL I VNVFA I | NRDPEYWKDA | EAF I PERFEN | NPNN I MGADY | 420 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 73 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 38 |
| | | 440 | | 460 | | 480 | |
| Protein_GAO | EYLPFGAGRR | MCPGAALGLA | NVQLPLANIL | YHFNWKL PNG | ASHDQLDMTE | SFGATVQRKT | 480 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 73 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 38 |
| | | | | | | | |
| Protein_GAO | EL I LVPSF * | | | | | | 489 |
| Prot_CiGAO (HR18.1) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 73 |
| Prot_CiGAO (HR18.2) | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 38 |

Supplementary Figure 8. Protein sequence of the gene *CiGAO* of mutant HR18 line. Sequences of WT *CiGAO* was aligned against the two mutated alleles of HR18 line. Allele 1 (HR18.1) has an insertion of an A and allele 2 (HR18.2) has a deletion of 8 nucleotide in their exon 1. Both resulting in a change in the coding frame and in appearance of stop codons. Stop codons were highlighted in pink.



Supplementary Figure 9. Sesquiterpene lactone content of roots of edited chicory regenerated from HR lines. The peak areas (mUA) of STLs in the roots of 7 genome edited chicory regenerated from HR lines were analyzed by HPLC and compared to WT chicory lines (Ctrl and Ctrl_HR). Panel A) is the total content of free forms of STLs and panel B) is the total content of oxalated forms of STLs. Gray bars correspond to control chicory lines, blue bars to *CiGAS-short* edited lines and orange bars to *CiGAO* mutants. The histograms show the modulation of the total content of free forms of STLs (A) or oxalated form of STLs (B) as a function of mutation on chicory lines. Statistical analysis was performed using non-parametric one-way ANOVA and Dunn's post-hoc test ($p < 0.005$).

7. References

- [1] Das S, Vasudeva N, Sharma S. *Cichorium intybus*: A concise report on its ethnomedicinal, botanical, and phytopharmacological aspects. *Drug Development and Therapeutics*. 2016; 7: 12
- [2] Roberfroid MB. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*. 2007; 137: 2493S-2502S
- [3] Nishimura M, Ohkawara T, Kanayama T, Kitagawa K, Nishimura H, Nishihira J. Effects of the extract from roasted chicory (*Cichorium intybus* L.) root containing inulin-type fructans on blood glucose, lipid metabolism, and fecal properties. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 2015; 5: 161–167
- [4] Le Bastard Q, Chapelet G, Javaudin F, Lepelletier D, Batard E, Montassier E. The effects of inulin on gut microbial composition: a systematic review of evidence from human studies. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020; 39: 403–413
- [5] Pouille CL, Jegou D, Dugardin C, Cudennec B, Ravallec R, Hance P, *et al.* Chicory root flour – A functional food with potential multiple health benefits evaluated in a mice model. *Journal of Functional Foods*. 2020; 74: 104174
- [6] Pouille CL, Ouaza S, Roels E, Behra J, Turret M, Molinié R, *et al.* Chicory: Understanding the effects and effectors of this functional food. *Nutrients*. 2022; 14: 957
- [7] Bossard S, Leveque M, Marboutin F, inventors. Use of a chicory flour for preparation of a food dough. EP: European Patent Office EP 1,399,025. 30 november 2005.
- [8] Price KR, Dupont MS, Shepherd R, Chan HW-S, Fenwick GR. Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops—coloured lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1990; 53: 185–192
- [9] Van Beek TA, Maas P, King BM, Leclercq E, Voragen AGJ, De Groot A. Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990; 38: 1035–1038
- [10] Poli F, Sacchetti G, Tosi B, Fogagnolo M, Chillemi G, Lazzarin R, *et al.* Variation in the content of the main guaianolides and sugars in *Cichorium intybus* var. “Rosso di Chioggia” selections during cultivation. *Food Chemistry*. 2002; 76: 139–147
- [11] Rees SB, Harborne JB. The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry*. 1985; 24: 2225–2231
- [12] Seto M, Miyase T, Umehara K, Ueno A, Hirano Y, Otani N. Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and cytotoxic activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1988; 36: 2423–2429
- [13] Sessa RA, Bennett MH, Lewis MJ, Mansfield JW, Beale MH. Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species: Major latex components are novel oxalate and sulfate conjugates of lactucin and its derivatives. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275: 26877–26884
- [14] Graziani G, Ferracane R, Sambo P, Santagata S, Nicoletto C, Fogliano V. Profiling chicory sesquiterpene lactones by high resolution mass spectrometry. *Food Research International*. 2015; 67: 193–198
- [15] de Kraker J-W, Franssen MCR, de Groot A, König WA, Bouwmeester HJ. (+)-Germacrene A biosynthesis: the committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiology*. 1998; 117: 1381–1392
- [16] Bogdanović M, Cankar K, Todorović S, Dragicević M, Simonović A, van Houwelingen A, *et al.* Tissue specific expression and genomic organization of bitter sesquiterpene lactone biosynthesis in *Cichorium intybus* L. (Asteraceae). *Industrial Crops and Products*. 2019; 129: 253–260

- [17] Nguyen DT, Göpfert JC, Ikezawa N, Macnevin G, Kathiresan M, Conrad J, *et al.* Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in asteraceae. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285: 16588–16598
- [18] Cankar K, Houwelingen A van, Bosch D, Sonke T, Bouwmeester H, Beekwilder J. A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Letters*. 2011; 585: 178–182
- [19] Ikezawa N, Göpfert JC, Nguyen DT, Kim S-U, O'Maille PE, Spring O, *et al.* Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286: 21601–21611
- [20] Liu Q, Majdi M, Cankar K, Goedbloed M, Charnikhova T, Verstappen FWA, *et al.* Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*. 2011; 6: e23255
- [21] Cankar K, Hakkert JC, Sevenier R, Campo E, Schipper B, Papastolopoulou C, *et al.* CRISPR/Cas9 targeted inactivation of the kauniolide synthase in chicory results in accumulation of costunolide and its conjugates in taproots. *Frontiers in Plant Science*. 2022; 13: 940003
- [22] Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, *et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR- Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*. 2015; 33: 1162–1164
- [23] Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, *et al.* ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*. 2017; 15: 207–216
- [24] Andersson M, Turesson H, Olsson N, Fält A-S, Ohlsson P, Gonzalez MN, *et al.* Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum*. 2018; 164: 378–384
- [25] Bernard G, Gagneul D, Alves Dos Santos H, Etienne A, Hilbert J-L, Rambaud C. Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 technology in chicory. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20: 1155
- [26] Bernard G, Buges J, Delporte M, Molinié R, Besseau S, Bouchereau A, *et al.* Consecutive action of two BAHD acyltransferases promotes tetracoumaroyl spermine accumulation in chicory. *Plant Physiology*. 2022; 189: 2029–2043
- [27] De Bruyn C, Ruttink T, Eeckhaut T, Jacobs T, De Keyser E, Goossens A, *et al.* Establishment of CRISPR/Cas9 genome editing in witloof (*Cichorium intybus* var. *foliosum*). *Frontiers in Genome Editing*. 2020; 2: 604876
- [28] Cankar K, Bundock P, Sevenier R, Häkkinen ST, Hakkert JC, Beekwilder J, *et al.* Inactivation of the germacrene A synthase genes by CRISPR/Cas9 eliminates the biosynthesis of sesquiterpene lactones in *Cichorium intybus* L. *Plant Biotechnology Journal*. 2021; 19: 2442–2453
- [29] Bogdanović M, Cankar K, Dragičević M, Bouwmeester H, Beekwilder J, Simonović A, *et al.* Silencing of germacrene A synthase genes reduces guaianolide oxalate content in *Cichorium intybus* L. *GM Crops & Food*. 2019; 11: 1–13
- [30] Bouwmeester HJ, Kodde J, Verstappen FWA, Altug IG, de Kraker J-W, Wallaart TE. Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiology*. 2002; 129: 134–144
- [31] Wu TD, Watanabe CK. GMAP: a genomic mapping and alignment program for mRNA and EST sequences. *Bioinformatics*. 2005; 21: 1859–1875
- [32] Scaglione D, Reyes-Chin-Wo S, Acquadro A, Froenicke L, Portis E, Beitel C, *et al.* The genome sequence of the outbreeding globe artichoke constructed de novo incorporating a phase-aware low-pass sequencing strategy of F1 progeny. *Scientific Reports* 2016; 6:19427

- [33] Reyes-Chin-Wo S, Wang Z, Yang X, Kozik A, Arikiti S, Song C, *et al.* Genome assembly with *in vitro* proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. *Nature Communications* 2017; 8:14953
- [34] Shen Q, Zhang L, Liao Z, Wang S, Yan T, Shi P, *et al.* The genome of *Artemisia annua* provides insight into the evolution of Asteraceae family and artemisinin biosynthesis. *Molecular Plant* 2018; 11:776-788.
- [35] Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. 2019; 20: 1160–1166
- [36] Haeussler M, Schönig K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaud J-B, *et al.* Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*. 2016; 17: 148
- [37] Bae S, Park J, Kim J-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*. 2014; 30: 1473–1475
- [38] Ma X, Liu Y-G. CRISPR/Cas9-based multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2016; 115: 31.6.1-31.6.21
- [39] Hance P, Martin Y, Vasseur J, Hilbert J, Trotin F. Quantification of chicory root bitterness by an ELISA for 11 β ,13-dihydrolactucin. *Food Chemistry*. 2007; 105: 742–748
- [40] Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. 2011; 7: 539
- [41] Sun L-Y, Touraud G, Charbonnier C, Tepfer D. Modification of phenotype in Belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: conversion from biennial to annual flowering. *Transgenic Research*. 1991; 1: 14–22
- [42] Bais HP, Venkatesh RT, Chandrashekar A, Ravishankar GA. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Witloof chicory – *In vitro* shoot regeneration and induction of flowering. *Current Science*. 2001; 80: 83–87
- [43] Bulgakov VP. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*. 2008; 26: 318–324
- [44] Dilshad E, Cusido RM, Estrada KR, Bonfill M, Mirza B. Genetic transformation of *Artemisia carvifolia* buch with *rol* genes enhances artemisinin accumulation. *PLOS ONE*. 2015; 10: e0140266
- [45] Malarz J, Stojakowska A, Kisiel W. Sesquiterpene lactones in a hairy root culture of *Cichorium intybus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2002; 57: 994–997
- [46] Testone G, Mele G, di Giacomo E, Tenore GC, Gonnella M, Nicolodi C, *et al.* Transcriptome driven characterization of curly- and smooth-leafed endives reveals molecular differences in the sesquiterpenoid pathway. *Horticulture Research*. 2019; 6: 1
- [47] Zhang B, Wang Z, Han X, Liu X, Wang Q, Zhang J, *et al.* The chromosome-scale assembly of endive (*Cichorium endivia*) genome provides insights into the sesquiterpenoid biosynthesis. *Genomics*. 2022; 114: 110400
- [48] Hansen CC, Nelson DR, Møller BL, Werck-Reichhart D. Plant cytochrome P450 plasticity and evolution. *Molecular Plant*. 2021; 14: 1244–1265
- [49] Eljounaidi K, Cankar K, Comino C, Moglia A, Hehn A, Bourgaud F, Bouwmeester H, Menin B, Lanteri S, Beekwilder J. Cytochrome P450s from *Cynara cardunculus* L. CYP71AV9 and CYP71BL5, catalyze distinct hydroxylations in the sesquiterpene lactone biosynthetic pathway. *Plant Science*. 2014; 223: 59–68

- [50] Boycheva S, Daviet L, Wolfender JL, Fitzpatrick TB. The rise of operon-like gene clusters in plants. *Trends in Plant Science* 2014; 19:447–459
- [51] Medema MH, Osbourn A. Computational genomic identification and functional reconstitution of plant natural product biosynthetic pathways. *Natural Product Reports*. 2016; 33:951–962
- [52] Cadalen T, Mörchen M, Blassiau C, Clabaut A, Scheer I, Hilbert J-L, *et al.* Development of SSR markers and construction of a consensus genetic map for chicory (*Cichorium intybus* L.). *Molecular Breeding*. 2010; 25: 699–722
- [53] Fan W, Wang S, Wang H, Wang A, Jiang F, Liu H, *et al.* The genomes of chicory, endive, great burdock and yacon provide insights into Asteraceae palaeo-polyploidization history and plant inulin production. *Molecular Ecology Resources*. 2022, 22:3124-3140
- [54] Ferioli F, Manco MA, D’Antuono LF. Variation of sesquiterpene lactones and phenolics in chicory and endive germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015; 39: 77–86
- [55] Kips L. Characterization and processing of horticultural byproducts: a case-study of tomato and Belgian endive roots. Thesis. Faculty of Biosciences Engineering, Ghent University, Belgium. 2017
- [56] Twarogowska A, Van Poucke C, Van Droogenbroeck B. Upcycling of Belgian endive (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) by-products. Chemical composition and functional properties of dietary fibre root powders. *Food Chemistry*. 2020; 332: 127444
- [57] Filippo D’Antuono L, Ferioli F, Manco MA. The impact of sesquiterpene lactones and phenolics on sensory attributes: An investigation of a curly endive and escarole germplasm collection. *Food Chemistry*. 2016; 199: 238–245
- [58] Giambanelli E, D’Antuono LF, Ferioli F, Frenich AG, Romero-González R. Sesquiterpene lactones and inositol 4-hydroxyphenylacetic acid derivatives in wild edible leafy vegetables from Central Italy. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018; 72: 1–6
- [59] Bennett MH, Gallagher MDS, Bestwick CS, Rossiter JT, Mansfield JW. The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1994; 44: 321–333
- [60] Wedge DE, Galindo JCG, Macías FA. Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry*. 2000; 53: 747–757
- [61] Verma R, Rawat A, Ganie SA, Agnihotri RK, Sharma R, Mahajan S, *et al.* *In vitro* antibacterial activity of *Cichorium intybus* against some pathogenic bacteria. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 2013; 3: 767–775
- [62] Khalaf HA, El-Saadani RM, El-Desouky AI, Abdeldaiem MH, Elmehy ME. Antioxidant and antimicrobial activity of gamma-irradiated chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves and roots. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2018; 12: 1843–1851
- [63] Bernard G, Alves Dos Santos H, Etienne A, Samaillie J, Neut C, Sahpaz S, *et al.* MeJA elicitation of chicory hairy roots promotes efficient increase of 3,5-diCQA accumulation, a potent antioxidant and antibacterial molecule. *Antibiotics*. 2020; 9: 659
- [64] Peña-Espinoza M, Boas U, Williams AR, Thamsborg SM, Simonsen HT, Enemark HL. Sesquiterpene lactone containing extracts from two cultivars of forage chicory (*Cichorium intybus*) show distinctive chemical profiles and *in vitro* activity against *Ostertagia ostertagi*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2015; 5: 191–200
- [65] Massoud I, Amin A. Chemical and technological studies on chicory (*Cichorium Intybus* L) and its applications in some functional food. *Journal of Advanced Agricultural Research*. 2009; 14: 22

- [66] Jeong D, Kim D-H, Oh Y-T, Chon J-W, Kim H, Jeong D-K, *et al.* Production of bioactive yoghurt containing *Cichorium intybus* L. (chicory) extract - Preliminary Study. *Journal of Milk Science and Biotechnology*. 2017; 35: 9–15
- [67] Kumar D, Dai R, Alam T, Sawant P. Effect of dried chicory root extract on sensory and physical characteristics of yoghurt-ice cream with addition of buttermilk using response surface methodology. *Research and reviews: Journal of Food and Dairy Technology*. 2017; 5: 16–25
- [68] Ferreira RE, Park KJ, Chang YK, Oliveira RA. Physical evaluation of cakes elaborated with chicory root flour used as source of inulin. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2016; 18: 155–159
- [69] Ivanišová E, Drevková B, Tokár M, Terentjeva M, Krajčovič T, Kačániová M. Physicochemical and sensory evaluation of biscuits enriched with chicory fiber. *Food Science and Technology International*. 2020; 26: 38–43
- [70] Bokić J, Kojić J, Krulj J, Pezo L, Banjac V, Škrobot D, *et al.* Development of a novel rice-based snack enriched with chicory root: physicochemical and sensory properties. *Foods*. 2022; 11: 2393
- [71] Kops J, Gevers Deijnoot PME. *Flora Batava: of Afbeelding en Beschrijving van Nederlandsche Gewassen*, XI. Deel. J. C. Sepp en Zoon, Amsterdam, The Netherlands. 1853
- [72] Peet R, Justice B, inventors; Blue Prairie Brands LLC, assignee. Low bitter chicory products. USA: United States patent US 20,160,095,337. 11 July 2017.
- [73] Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, *et al.* Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*. 2014; 32: 947–951
- [74] Svitashv S, Young JK, Schwartz C, Gao H, Falco SC, Cigan AM. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology*. 2015; 169: 931–945
- [75] Zhou H, He M, Li J, Chen L, Huang Z, Zheng S, *et al.* Development of commercial thermo-sensitive genic male sterile rice accelerates hybrid rice breeding using the CRISPR/Cas9-mediated TMS5 editing system. *Scientific Reports*. 2016; 6: 37395
- [76] Sun Y, Jiao G, Liu Z, Zhang X, Li J, Guo X, *et al.* Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-Mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in Plant Science*. 2017; 8

8. Éléments complémentaires.

8.1. Matériel et Méthodes.

8.1.1. Matériel végétal.

Des vitroplants de chicorée ChicBitter002 et des semis *in vitro* de la composante ChicBitter003 ont été utilisés pour générer des lignées de chevelus racinaires. Ils ont été infectés par *R. rhizogenes* 15834 WT ou préalablement transformés avec un plasmide binaire. Les lignées de chevelus racinaires générées ont été maintenues sur milieu solide MSHR/2 (Murashige et Skoog Hairy Root medium) selon la composition suivante : 0,5X de macro et micro-éléments, 0,5X de Fer-EDTA, 0,5X de vitamines [Murashige et Skoog, 1962], saccharose 30 g/L, agar 6 g/L, pH 5,6. Les vitroplants de chicorée ChicBitter002 utilisés pour les croisements ont d'abord été maintenus sur milieu solide H10 (macro et micro-éléments de Heller [Heller, 1953], Fer-EDTA [Murashige et Skoog, 1962], saccharose 10 g/L, agar 6 g/L, pH 5,5) avant d'être transférés en pots, en serre S2, après une période d'acclimatation en mini-serre (S2) de 15-20 jours. Les mêmes conditions de culture ont été appliquées aux bourgeons issus des lignées de chevelus racinaires de la chicorée ChicBitter002, qui ont servi pour le prélèvement de latex, les croisements et les autofécondations. Les graines des composantes ChicBitter003 et ChicBitter004, destinées aux expériences de croisement, ainsi que les graines obtenues par autofécondation des plantes éditées ont été semées et cultivées en serre S2 selon un cycle 16h de jour / 8h de nuit. Les plantes âgées de 3 mois des composantes ChicBitter003, ChicBitter004 et de la chicorée ChicBitter002 ont été vernalisées en chambre froide (4 à 6 °C) pendant 2 mois selon un cycle 12h de lumière / 12h de d'obscurité.

8.1.2. Définition des séquences cibles et constructions plasmidiques.

La définition des séquences cibles dans le génome de la chicorée ChicBitter002 ainsi que la vérification de leur utilisation pour l'édition des gènes de la composante ChicBitter003 ont été réalisées comme décrites dans le chapitre 1 de cette thèse. Leurs séquences sont reportées dans le **Tableau 2.2**. Les vecteurs plasmidiques binaires utilisés pour transformer la souche 15834 de *R. rhizogenes* ont été construits comme décrit précédemment par Ma et Liu [2016], Bernard *et al.* [2019] et dans l'article ci-dessus. Les plasmides binaires finaux obtenus contiennent chacun 2 sgRNAs correspondant aux séquences cibles identifiées. Ils sont nommés pYLCRISPR-GASshort, pYLCRISPR-GASlong et pYLCRISPR-GAO.

8.1.3. Extraction ADN et détection des mutations.

Les ADN des lignées éditées de chevelus racinaires de la chicorée ChicBitter002, de la composante ChicBitter003 et des feuilles des lignées descendantes des chicorées ChicBitter002 éditées ont été extraits via le kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole du fabricant. La présence ou l'absence des gènes *cas9* et *rolB* a été vérifiée par PCR à l'aide des paires d'amorces C9-F / C9-R et RolB respectivement (**Tableau 2.2**). Les potentielles mutations ont été détectées par génotypage suite à l'amplification des régions cibles des gènes *GAS-S*, *GAS-L* ou *GAO*, par des paires amorces marquées (S1, S2, S3, S5, GAO et LF, **Tableau 2.2**), selon le protocole décrit dans l'article en première partie de ce chapitre. Les séquences de gènes mutés ont été obtenues par séquençage Sanger en utilisant les mêmes amorces que pour le génotypage (GATC service, Eurofins Genomics, Ebersberg, Allemagne)

8.1.4. Analyse du latex de feuilles de chicorées.

Des incisions ont été réalisées à la base des feuilles de chicorée ChicBitter002 éditées issues de chevelus racinaires. L'exsudat de latex a été récolté via la pointe d'un cône et immédiatement mélangé avec une solution de 1 mL de méthanol additionné de 1% d'acide phosphorique. Les échantillons ont été centrifugés 10 min à 14 000 g, à 4 °C, et le surnageant a été récupéré pour analyse. La filtration des surnageants récupérés a été réalisée sur plaque Acrocep 0,45 µm. L'analyse des échantillons a été réalisée par HPLC/DAD (Shimadzu, Marne-la-Vallée). Une colonne Kinetex PFP 100 x 4,6 mm (2,6 µm) (Phenomenex, Le Pecq), chauffée à 45°C par le four, a été utilisée pour la séparation des composés. Les solvants de séparation utilisés sont l'eau ultra-pure (Solvant A) et l'acétonitrile (Solvant B), tous deux acidifiés avec 0,1% d'acide ortho-phosphorique. Le gradient d'élution est le suivant : à 0 min, 5% de solvant B ; gradient de 6 min à 20% de solvant B ; 1 min de gradient à 25% de solvant B ; retour à 5% de solvant B suivi par 7 min de rééquilibration. Le débit de travail est de 1,1 mL/min et le volume d'injection est de 10 µL. La détection des lactones sesquiterpéniques est réalisée à 254 nm.

Tableau 2.2. Liste des oligonucléotides utilisés.

| Nom | Sens | Séquence 5'-3' |
|----------|---------|---|
| GAS-S_T1 | Forward | ATCGGTGTAGTAAACACTCTCGA |
| | Reverse | AAACTCGAGAGTGTACTACAC |
| GAS-S_T2 | Forward | ATCGAACCATTTGGCATCCCCTGA |
| | Reverse | AAACTCAGGGGATGCCAATGGTT |
| GAO_T1 | Forward | ATCGTTGTTGGATTTGGGACGAG |
| | Reverse | AAACCTCGTCCCAATCCAACAA |
| GAO_T2 | Forward | ATCGGAGTCGCGATGCCTCTGGA |
| | Reverse | AAACTCCAGAGGCATCGGACTC |
| GAS-L_T1 | Forward | ATCGTTGGACAGACAACGGTCGG |
| | Reverse | AAACCCGACCGTTGTCTGTCAA |
| GAS-L_T2 | Forward | ATCGCAACTTCCACCTTCGATCTGG |
| | Reverse | AAACCCAGATCGAAGGTGGGAAGTTG |
| GG1-F | Forward | ATATATGGTCTCACTCGAAAGAACCAACCTGTTTTCATAGC |
| GG1-R | Reverse | ATTATTGGTCTCAACCTAAAAAAGCACCGACTCGGTG |
| GG2-F | Forward | ATATATGGTCTCAAGGTAAAGAACCAACCTGTTTTCATAGC |
| GG2-R | Reverse | ATTATTGGTCTCAACCGAAAAAAGCACCGACTCGGTG |
| RolB | Forward | TGGATCCCAAATTGCTATTCTTCCACGA |
| | Reverse | TTAGGCTTCTTCTCAGGTTTACTGCAGC |
| C9-F | Forward | AAGCACGTTGCTCAGATCCT |
| C9-R | Reverse | CGTTCGTCTCGATAAGAGG |
| S1 | Forward | AGAATCTATTAATCGGCTTT |
| | Reverse | [HEX] TAAGGATCATCGCTTAATTA |
| S2 | Forward | [HEX] CCCAGAATCTATTAATTGGT |
| | Reverse | AAGTTAGGTTATTTCCGTTG |
| S3 | Forward | [6-FAM] AATGATTACTCCGGTTTAGT |
| | Reverse | TTCCGATTCTTAATACTGA |
| S5 | Forward | [6-FAM] GTTCTCGTGCATTATACTTG |
| | Reverse | ACCTCCCTATGTATGTAT |
| GAO | Forward | [HEX] TCACTACTTCCATTGCTCT |
| | Reverse | ACTCTTTGATCCTTGATT |
| LF | Forward | [6-FAM] CAGAAGTCTCACAAGTCCT |
| | Reverse | CTTGATCATTCTACTATC |

Les sites de liaisons utilisés pour insérer les sgRNAs dans les plasmides intermédiaires sont en gras. [6-FAM] et [HEX] sont les fluorophores utilisés pour marquer les amorces à leur extrémité 5'.

8.2. Résultats et discussions.

8.2.1. Dosage des STLs dans du latex des feuilles de chicorées mutantes

Chez les Astéracées, le latex est connu pour être constitué majoritairement de STLs [Sessa *et al.*, 2000 ; Funk *et al.*, 2009 ; Huber *et al.*, 2015]. Il est stocké dans les canaux laticifères et est exsudé en réponse à une blessure. Il présente donc l'intérêt d'être rapide et facile à obtenir pour analyse. Du latex de feuilles de chicorées a donc été récolté sur des plantes régénérées à partir de lignées de chevelus racinaires mutantes. Les données de cette analyse préliminaire concordent avec les résultats présentés dans l'article, en première partie de ce chapitre.

Parmi les chicorées mutantes utilisées pour l'analyse du latex, on retrouve des plantes de la lignée : HR1, une chicorée mutante homozygote bi-allélique sur la copie *GAS-S1* ; HR4, une mutante hétérozygote bi-allélique sur la copie *GAS-S2* ; HR9, une mutante mono-allélique pour la copie *GAS-S1* et *GAS-S2* ; HR12, une mutante hétérozygote bi-allélique sur la copie *GAS-S1* et homozygote bi-allélique sur la copie *GAS-S2* ; HR14, une mutante hétérozygote bi-allélique du gène *GAO* ; et HR17, une mutante mono-allélique du gène *GAO*. Les séquences mutées de ces lignées sont détaillées en **Figure 2.3**.

| | | Target 1 | PAM | PAM | Target 2 | T1/T2 | | |
|--------|--------|-------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
| A | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCAT | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT | | |
| | GAS-S1 | HR1.1 | AAGAGTGTAGTAAACAC | --- | CGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCAAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | -3/+1 |
| | | HR1.2 | AAGAGTGTAGTAAACAC | --- | CGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCAAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | -3/+1 |
| | HR9.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCAT | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT | | |
| | HR9.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCAT | ----- | GATGCCAATGGTTGAGG | WT/-5 | |
| | HR12.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCA | TGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 | | |
| | HR12.2 | AAGAGTGTAGTAAACA | ----- | (...) | ----- | GGGGATGCCAATGGTTGAGG | -58 | |
| | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCAT | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT | | |
| | GAS-S2 | HR4.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | CCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCAAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | +1/+1 | |
| | | HR4.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | TC | ----- | (...) | ----- | GTT |
| HR9.1 | | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCAT | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT | | |
| HR9.2 | | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | TCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCA | ----- | TGCCAATGGTTGAGG | +1/-6 |
| HR12.1 | | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCA | AGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 | | |
| HR12.2 | | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCA | AGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 | | |
| B | WT | TCGCCA | CTCGTCCCAAAATCCAACAAA | AAGCGCCT | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/WT | | |
| | HR14.1 | TCGCCA | CTCGTCCCAAAATCCAACAAA | AAGCGCCT | TCCA - | AGGCATCGCGACTCCCAA | WT/-1 | |
| | HR14.2 | TCGCCA | CTCGTCCCAAAATCCAACAAA | AAGCGCCT | TCCA | AGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/+1 | |
| | HR17.1 | TCGCCA | CTCGTCCCAAAATCCAACAAA | AAGCGCCT | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/WT | | |
| | HR17.2 | TCGCCA | CTC | ----- | ----- | AGAGGCATCGCGACTCCCAA | -27 | |

Figure 2.3. Séquences de lignées de chevelus racinaires obtenues par édition par CRISPR/Cas9. A) Analyse des séquences nucléotidiques des lignées de chevelus racinaires éditées pour les gènes *GAS-S*. B) Analyse des séquences nucléotidiques des lignées de chevelus racinaires éditées pour le gène *GAO*. Les séquences cibles sont en bleu et les motifs PAM sont soulignés. Les mutations sont en rouge et les changements dans la séquence sont indiqués à droite de chaque séquence. HR.x.x : Chevelus racinaires x, allèle x ; WT : sauvage ; Target 1 : 1ère cible ; Target 2 : 2ème cible ; + : insertion ; - : délétion.

Le latex issu des feuilles de ces plantes mutées a été comparé à celui d'une plante notée « Ctrl_HR » correspondant à une chicorée régénérée d'une lignée de chevelus racinaires non mutée. La comparaison des lignées mutées avec la lignée Ctrl_HR a montré une importante réduction des aires sous le pic des 6 STLs identifiées pour la lignée HR12, bi-allélique mutante pour les copies *GAS-S1* et *GAS-S2* (**Figure 2.4** et **Figure 2.5**). Une tendance à la diminution des STLs est aussi visible pour la lignée

HR14, bi-allélique mutante pour le gène *GAO* même si cela reste très léger au regard du contenu total en STLs (**Figure 2.4 et Figure 2.5**). Les résultats obtenus sont à considérer avec précautions puisqu'ils ne comportent pas de réplicats biologiques et que seules 6 STLs sont prises en compte dans cette analyse du contenu en STLs. Cependant, ils permettent de montrer une diminution du contenu en STLs dans les feuilles et confirment ceux obtenus lors de l'analyse de la racine des plantes régénérées, qui prenaient en compte 15 STLs identifiés (**Figure 5 de l'article**).

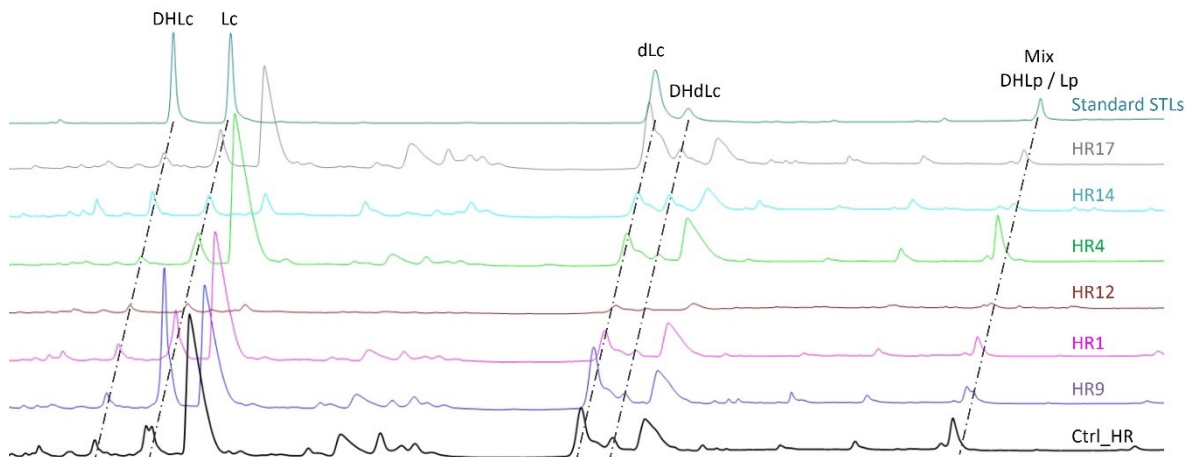


Figure 2.4. Analyse par HPLC du contenu en STLs dans le latex de feuilles de chicorées mutantes (absorbance à 254nm). La présence de standards permet l'identification de 6 STLs dans le latex des plantes : (DHLc) 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine ; (Lc) Lactucine, (dLc) dihydro-8-déoxylactucine, (DHdLc) 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine, (Mix DHLp/Lp) mix de 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine et lactucopirine. Ctrl_HR : lignée contrôle non mutée ; HR9 : mutant mono-allélique sur *GAS-S1* et *GAS-S2* ; HR1 : mutant bi-allélique sur *GAS-S1* ; HR12 : mutant bi-allélique sur *GAS-S1* et *GAS-S2* ; HR4 : mutant bi-allélique sur *GAS-S2* ; HR14 : mutant bi-allélique sur *GAO* ; HR17 : mutant mono-allélique sur *GAO*.

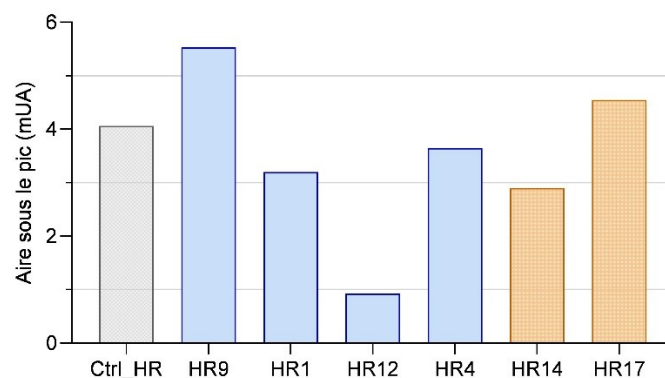


Figure 2.5. Contenu total en STLs dans le latex des feuilles de chicorées éditées. Les aires sous le pic (mUA) des STLs de 5 chicorées régénérées de lignées de chevelus racinaires éditées ont été analysées par HPLC et comparées à une chicorée régénérée d'une lignée de chevelu racinaire WT. Le contenu en STLs total correspond à la somme de 6 STLs (Lc, DHLc, dLc, DHdLc et mix DHLp/Lp) identifiés dans la figure 2.3. En gris : lignée contrôle, en bleu : lignées éditées pour le gène *GAS-S*, en orange : lignées éditées pour le gène *GAO*.

Le latex se présente sous forme d'un liquide visqueux, ce qui peut provoquer des difficultés pour le prélèvement d'une quantité exacte en vue d'un dosage. De plus, sa composition se dégrade

rapidement. En effet, le prélèvement du latex a été réalisé selon le protocole de Sessa *et al.* [2000] qui recommandent l'utilisation d'acide phosphorique dans la solution de prélèvement pour éviter une oxydation du latex. Cependant, cela ne permet pas de stabiliser les métabolites extraits puisque lors d'un nouveau passage des échantillons présentés en **Figure 2.4**, une dégradation de la quasi-totalité des STLs a pu être observée malgré une conservation à -20°C. L'analyse du latex constitue néanmoins une méthode rapide et non destructrice, grâce à sa capacité à être exsudé lorsque l'on coupe une feuille de chicorée. C'est une méthode de détection précoce de la teneur en STLs dans les plantes mutées, qui peut s'effectuer à tout moment du développement de la plante après quelques semaines en serre mais dont une optimisation de la méthode de prélèvement est nécessaire pour standardiser et étendre son utilisation.

8.2.2. Analyse des croisements et autofécondations de chicorées mutantes.

Les lignées de chevelus racinaires, issues de la chicorée, possèdent la particularité de régénérer spontanément des plantes entières. Toutefois, les plantes obtenues sont des OGMs et l'expression du T_L-DNA de *R. rhizogenes* 15834 dans la plante induit des modifications du phénotype comme une nanification, une floraison précoce sans besoin de vernalisation, ainsi que la génération de racines adventives limitant la tubérisation de la racine. Ces plantes étant obtenues à partir du clone de chicorée ChicBitter002, elles présentent la capacité d'être auto-fertiles. Cela a permis de réaliser des croisements et des autofécondations durant l'été 2021 en serre S2 (niveau 2 de confinement). Les graines issues de ces croisements ont été semées et cultivées afin de détecter la présence des mutations ainsi que des ADN-T. Les résultats concernant les mutations sont reportés dans le **Tableau 2.3**. Parmi les différents résultats obtenus, seuls ceux de la lignée HR12 sont en adéquation avec les résultats attendus : 100% de mutants étaient attendus et 100% de mutants ont été obtenus. En effet, cette lignée étant mutante bi-allélique pour les copies *GAS-S1* et *GAS-S2*, il est attendu que sa descendance possède le même profil. Les résultats obtenus pour la lignée HR3 sont basés sur l'analyse d'une seule plante ce qui ne permet pas de refléter correctement les profils alléliques retrouvés dans la descendance (**Tableau 2.3**). Concernant les résultats de la lignée HR10, ceux-ci ne correspondent pas totalement aux résultats attendus. En effet, pour cette lignée mutée sur un seul allèle de *GAS-S1* et de *GAS-S2*, on retrouve bien les 50% attendus de mutants mono-alléliques pour ces deux copies. Cependant, le taux de mutants bi-alléliques obtenus est plus important que prévu avec un taux de 44,4% (**Tableau 2.3**). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la transformation médiée par *R. rhizogenes* est une transformation stable provoquant l'intégration de l'ADN-T contenant le gène *cas9* dans le génome des lignées de chevelus racinaires édités, continuant ainsi à générer des événements d'édition.

Tableau 2.3. Phénotype des descendance des mutants HR3, HR10 et HR12, obtenues par autofécondation.

| Lignée | Plantes obtenues après germination des graines | Profil allélique | Mutants obtenus (%) | Mutants attendus (%) |
|--------|--|----------------------|---------------------|----------------------|
| HR3 | 1 | Mutant bi-allélique | 0 | 25 |
| | | Mutant monoallélique | 100 | 50 |
| | | Sauvage | 0 | 25 |
| HR10 | 9 | Mutant bi-allélique | 44,4 | 25 |
| | | Mutant monoallélique | 55,6 | 50 |
| | | Sauvage | 0 | 25 |
| HR12 | 7 | Mutant bi-allélique | 100 | 100 |
| | | Mutant monoallélique | 0 | 0 |
| | | Sauvage | 0 | 0 |

Les résultats obtenus lors de cette analyse doivent toutefois être considérés avec précaution étant donné le faible nombre de plantes analysées. Ceci peut être expliqué par différents aléas survenus au cours de l'expérience et qui ont eu pour conséquence la mort de nombreuses plantes. En parallèle de l'expérience présentée ci-dessus, des croisements entre des chicorées non transformées et des chicorées issues de lignées de chevelus racinaires éditées étaient prévus afin d'estimer si les ADN-T introduits dans le génome des plantes pouvaient facilement être éliminés. Les chicorées non transformées n'étant pas capables de fleurir précocement comme les plantes issues de chevelus racinaires, il a été nécessaire de passer par une étape de vernalisation pour induire la montée en fleurs. Or, aucune des plantes vernalisées n'est montée en fleurs. Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer cette absence de montée en fleurs chez les plantes non transformées. Tout d'abord, l'étape de vernalisation réalisée était peut-être trop courte et aurait nécessité quelques semaines voire 1 mois supplémentaire. Les articles mentionnant la vernalisation de la chicorée préconisent des périodes de froid allant de 3 semaines à 9 semaines [Gianquinto et Pimpini, 1995 ; Demeulemeester et De Proft, 1999 ; Dielen *et al.*, 2005 ; Mathieu *et al.*, 2020] et démontrent la nécessité d'adapter le temps de vernalisation en fonction du matériel utilisé. Ensuite, les plantes non transformées étaient peut-être trop jeunes et n'ont pas eu le temps d'accumuler les réserves nécessaires à la vernalisation. Une étude réalisée par Gianquinto [1997] a montré que des chicorées âgées de 30 ou 50 jours étaient capables de monter en fleurs après vernalisation, même si les chicorées les plus âgées étaient plus nombreuses à fleurir, toutefois Demeulemeester et De Proft [1999] ont démontré que des chicorées âgées de moins de 100 jours n'étaient pas capables de monter en fleurs même après une étape de vernalisation. Enfin, la dernière hypothèse est que nos plantes ont subi une dévernalisation à la suite de problèmes de dérégulation de la température et de la lumière dans les chambres froides où les plantes étaient stockées. En effet, il a été démontré que la chaleur pouvait diminuer voire effacer les effets de vernalisation [Gianquinto et Pimpini, 1995 ; Dielen *et al.*, 2005 ; Mathieu *et al.*, 2020].

Une nouvelle expérience de croisements et autofécondations a été réalisée lors de l'été 2022 avec un nombre de plantes plus important et avec des chicorées non transformées dont le temps de vernalisation a été allongé à 3 mois. Les graines récoltées à la suite de cette expérience n'ont toutefois pas encore été analysées.

8.2.3. Génération de chevelus racinaires édités par CRISPR/Cas9 chez la composante ChicBitter003.

Les premiers travaux réalisés sur la chicorée ChicBitter002 ont montré que la transformation médiée par *R. rhizogenes* permettait d'obtenir rapidement des chevelus racinaires avec un taux d'efficacité de mutation par CRISPR/Cas9 de 26%, capables de régénérer spontanément des plantes entières. Afin de vérifier si des résultats similaires pouvaient être obtenus sur d'autres génotypes de chicorée, le transfert de cette méthode de transformation a été effectué sur du matériel végétal présentant un intérêt pour les sélectionneurs. La composante ChicBitter003 a été choisie car elle est une composante commune à 2 variétés différentes et présente donc plus d'intérêt pour les sélectionneurs que les autres composantes.

A la suite de l'action du système d'édition CRISPR/Cas9, des mutants pour les gènes *GAS-S*, *GAO* ont ainsi été obtenus, mais aussi des mutants pour le gène *GAS-L*, ce qui n'avait pas été le cas lors de l'édition de la chicorée ChicBitter002. Sur les cinquante lignées générées à la suite de la transformation avec le plasmide binaire pYLCRISPR-GASshort, seules 23 lignées avaient intégré le plasmide et l'ADN-T dans leur génome. L'analyse par séquençage Sanger a révélé que sur les 23 lignées transformées, 3 lignées sont mutées pour au moins une copie du gène *GAS-S* et 1 lignée est mutante bi-allélique sur 3 copies du gène *GAS-S* (**Tableau 2.4, Figure 2.6**). Parmi les 3 lignées mutées sur une seule copie du gène *GAS-S*, l'une est mono-allélique et les deux autres sont bi-alléliques, provoquant un knock-out de la copie. L'analyse des cinquante lignées générées après transformation avec le plasmide binaire pYLCRISPR-GASlong a mis en évidence que 21 lignées avaient intégré le plasmide et l'ADN-T dans leur génome. Le séquençage Sanger a révélé que sur ces 21 lignées transformées, seules 3 sont mutantes dont l'une est bi-allélique et génère un knock-out du gène, et les deux autres sont mono-alléliques (**Tableau 2.4, Figure 2.7**). Concernant les lignées transformées avec le plasmide binaire pYLCRISPR-GAO, sur les cinquante lignées générées, seules 23 avaient intégré le plasmide et l'ADN-T dans leur génome. L'analyse par séquençage Sanger a révélé que sur ces 23 lignées, 5 lignées sont mutées dont 2 étant des mutants bi-alléliques (**Tableau 2.4, Figure 2.8**). L'ensemble de ces résultats montre que la fréquence de mutation de ChicBitter003 (17,9%) est moins élevée que pour la

chicorée ChicBitter002 (26%) malgré une fréquence de knock-out plus haute (10,4% vs. 9,6%) (**Tableau 2.4**).

| | | Target 1 | PAM | PAM | Target 2 | T1/T2 |
|--------|-------|-------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------------------|--------|
| GAS-S1 | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCAT</u> | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | CR1.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCA</u> | TGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| | CR1.2 | AAGAGTGTAGTAAACAC - - - | <u>CGA</u> <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCAT</u> | TGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| | CR2.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCA</u> | - - - - - ATGCCAATGGTTGAGG | WT/-4 |
| | CR2.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCA</u> | - - - - - GTTGAGG | WT/-13 |
| | CR3.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCAT</u> | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | CR3.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCA</u> | AGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| GAS-S2 | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCAT</u> | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | CR2.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCA</u> | - - - - - ATGCCAATGGTTGAGG | WT/-4 |
| | CR2.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCA</u> | CGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| | CR4.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCA</u> | AGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/+1 |
| | CR4.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | <u>CGA</u> <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCATCA</u> | - - - - - ATGGTTGAGG | +1/-12 |
| GAS-S3 | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> TAA (...) | <u>GTTCCATCAA</u> | *GGGATGC*CCA* <u>TGGTCG</u> AGG | WT/WT |
| | CR2.1 | AAGAGTGTAGTAAACAC - - | <u>GCGA</u> <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCAT</u> | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | -2/SNP |
| | CR2.2 | AAGAGTGTAGTAAACAC - - | <u>GCGA</u> <u>AGG</u> CAA (...) | <u>ATTCCAT</u> | CAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | -2/SNP |

Figure 2.6. Séquences des copies du gène GAS-S de lignées de chevelus racinaires de ChicBitter003 mutées. Les séquences cibles sont en bleu et les motifs PAM sont soulignés. Les mutations sont en rouge et les changements dans la séquence sont indiqués à droite de chaque séquence. CR.x.x : Chevelus racinaires x, allèle x ; WT : sauvage ; Target 1 : 1^{ère} cible ; Target 2 : 2^{ème} cible ; + : insertion ; - : délétion.

| | PAM | Target 1 | Target 2 | PAM | T1/T2 | |
|-------|---------------|---|---------------|-------------------------|---------------|-------|
| WT | <u>CAGCCC</u> | <u>CGACCGTTGTCTGTCCAACCGA</u> (...) | <u>TGGCCA</u> | <u>ACTCCCACCTTCGATC</u> | <u>TGGGCT</u> | WT/WT |
| CR5.1 | <u>CAGCCC</u> | - - - - - <u>GTTGTCTGTCCAACCGA</u> (...) | <u>TGGCCA</u> | <u>ACTCCCACCTTCGATC</u> | <u>TGGGCT</u> | -4/WT |
| CR5.2 | <u>CAGCCC</u> | - - - - - <u>GTTGTCTGTCCAACCGA</u> (...) | <u>TGGCCA</u> | <u>ACTCCCACCTTCGATC</u> | <u>TGGGCT</u> | -4/WT |
| CR6.1 | <u>CAGCCC</u> | <u>CGACCGTTGTCTGTCCAACCGA</u> (...) | <u>TGGCCA</u> | <u>ACTCCCACCTTCGATC</u> | <u>TGGGCT</u> | WT/WT |
| CR6.2 | <u>CAGCCC</u> | <u>AGACCGTTGTCTGTCCAACCGA</u> (...) | <u>TGGCCA</u> | <u>ACTCCCACCTTCGATC</u> | <u>TGGGCT</u> | +1/WT |
| CR7.1 | <u>CAGCC</u> | - - - - - <u>GTTGTCTGTCCAACCGA</u> (...) | <u>TGGCCA</u> | <u>ACTCCCACCTTCGATC</u> | <u>TGGGCT</u> | -6/WT |
| CR7.2 | <u>CAGCC</u> | - - - - - <u>ACCGTTGTCTGTCCAACCGA</u> (...) | <u>TGGCCA</u> | <u>ACTCCCACCTTCGATC</u> | <u>TGGGCT</u> | -4/WT |

Figure 2.7. Séquences du gène GAS-L de lignées de chevelus racinaires de ChicBitter003 mutées. Les séquences cibles sont en bleu et les motifs PAM sont soulignés. Les mutations sont en rouge et les changements dans la séquence sont indiqués à droite de chaque séquence. CR.x.x : Chevelus racinaires x, allèle x ; WT : sauvage ; Target 1 : 1^{ère} cible ; Target 2 : 2^{ème} cible ; + : insertion ; - : délétion.

| | PAM | Target 1 | PAM | Target 2 | T1/T2 |
|--------|-----------------|------------------------|------------------|--------------------------|--------|
| WT | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGGCTCCAA | WT/WT |
| CR8.1 | TCG | ----- CCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGGCTCCAA | -15/WT |
| CR8.2 | TCG <u>CCAC</u> | ----- | | TCGCGGCTCCAA | -37 |
| CR9.1 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- TCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCA ----- TCGCGCTCCAA | -8/-6 |
| CR9.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- TCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCA ----- TCGCGCTCCAA | -8/-6 |
| CR10.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGGCTCCAA | WT/WT |
| CR10.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- CAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGGCTCCAA | -10/WT |
| CR11.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGGCTCCAA | WT/WT |
| CR11.2 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAAGAGGCATCGCGGCTCCAA | WT/+1 |
| CR12.1 | TCG <u>CCA</u> | CTC - TCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAG --- CATCGCGGCTCCAA | -1/-3 |
| CR12.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC - TCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAG --- CATCGCGGCTCCAA | -1/-3 |

Figure 2.8. Séquences du gène *GAO* de lignées de chevelus racinaires de ChicBitter003 mutées. Les séquences cibles sont en bleu et les motifs PAM sont soulignés. Les mutations sont en rouge et les changements dans la séquence sont indiqués à droite de chaque séquence. CR.x.x : Chevelus racinaires x, allèle x ; WT : sauvage ; Target 1 : 1^{ère} cible ; Target 2 : 2^{ème} cible ; + : insertion ; - : délétion.

Tableau 2.4. Aperçu des événements de mutation induits par CRISPR/Cas9 dans la composante ChicBitter003 transformée avec *R. rhizogenes*.

| Gènes | <i>GAS-S</i> | <i>GAS-L</i> | <i>GAO</i> | Control |
|--|--------------|--------------|------------|---------|
| Nombre de lignées générées | 50 | 50 | 50 | 6 |
| Total | 23 | 21 | 23 | 6 |
| WT | 19 | 17 | 18 | 6 |
| Nombre de lignées contenant le plasmide binaire | | | | |
| 1 copie mutée (KO) | 3 (2) | 3 (1) | 5 (2) | 0 |
| 2 copies mutées (KO) | 0 (0) | nc | nc | nc |
| 3 copies mutées (KO) | 1 (1) | nc | nc | nc |
| 4 copies mutées (KO) | 0 (0) | nc | nc | nc |
| Fréquence de mutation | 17,4% | 14,3% | 21,7% | 0.0% |
| Fréquence de KO de gène | 13% | 4,8% | 8,7% | 0.0% |

WT : lignée non mutée ; KO: Knock-Out dû à la présence d'un codon stop prématuré ; nc: non concerné. La fréquence de mutation a été calculée en divisant la somme des lignées mutantes par le nombre total de lignées contenant le vecteur binaire. La fréquence de KO de gène a été calculée en divisant la somme des lignées mutées (KO) par le nombre total de lignées contenant le vecteur binaire.

L'action du système CRISPR/Cas9 sur les séquences cibles des gènes *GAS* et *GAO* confirme que la définition de nouvelles cibles n'est pas nécessaire pour cette composante malgré la présence de variabilité sur au moins une des séquences cibles du gène *GAO*.

Une régénération spontanée de plantes était attendue sur ces lignées de chevelus racinaires, avec comme objectif d'analyser leur contenu en STLs et comparer avec les résultats obtenus pour la chicorée ChicBitter002. Toutefois, seulement 4 ou 5 plantes ont pu être régénérées, à partir des

chevelus racinaires, souvent provenant de lignées ne présentant pas de mutation. De nombreux facteurs rentrent en compte dans l'efficacité de transformation par *R. rhizogenes*. Cette efficacité peut varier en fonction du tissu infecté, de l'espèce végétale mais aussi de la souche bactérienne [Giri *et al.*, 2001 ; Chandran et Potty, 2008 ; Md Setamam *et al.*, 2014]. On peut aussi présumer que la composante ChicBitter003 est moins susceptible de produire des plantes à partir des lignées de chevelus racinaires, ce qui est un frein quant à la confirmation de l'effet des mutations sur la production des STLs dans les plantes. La régénération de plantes à partir de chevelus racinaires semble donc génotype-dépendante chez la chicorée.

L'utilisation de la transformation médiée par *R. rhizogenes* pour réaliser de l'édition par CRISPR/Cas9 présentait des avantages attirants tels que l'obtention rapide de matériel, la capacité de la chicorée à régénérer spontanément des plantes, mais aussi le fait que la technique était opérationnelle au sein du laboratoire. Lors des travaux sur la chicorée ChicBitter002, cette technique s'est avérée être un avantage dans le but d'établir la preuve de concept que les mutations des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse provoquaient une réduction de la production des STLs. Néanmoins, lors du transfert de la méthode sur la composante ChicBitter003, l'aspect génotype-dépendant de la régénération s'est avérée être un obstacle. De plus, toutes les plantes régénérées comportaient un ou des ADN-T bactériens, ce qui provoque un changement de phénotype biaisant les données d'analyse métabolique. En effet, une augmentation de la production de métabolites pour les plantes régénérées a pu être observée et a été rapportée dans l'article présenté en première partie de ce chapitre. Malgré l'intérêt qu'apporte la rapidité de cette méthode, les difficultés pour l'obtention de plantes utilisables en sélection sont trop importantes et le passage à une méthode de transfection de protoplastes a donc été envisagée. Ce procédé a l'avantage de permettre la régénération de plus de plantes, sans ADN-T, et bien que plusieurs mois soient nécessaires pour l'obtention de matériel analysable et que le screening rapide des mutants ne soit pas possible, elle semble plus adaptée à d'éventuelles applications. Le choix de réaliser l'édition par CRISPR/Cas9 en utilisant la méthode de transfection des protoplastes a donc été fait pour les composantes de chicorées.

CHAPITRE 3 : Edition par CRISPR/Cas9 des gènes impliqués dans la synthèse des STL, via une transformation de protoplastes médiée par PEG.

1. Introduction.

Dans le chapitre précédent, nous avons établi la preuve de concept que la mutation simultanée des copies *GAS-S1* et *GAS-S2* du gène *GAS* ou celle du gène *GAO*, conduit à une diminution significative du contenu en STLs des racines de chicorée. Cette réduction a été mise en évidence lorsque les copies *GAS-S1* et *GAS-S2* présentent des mutations sur leurs deux allèles ou lorsque le gène *GAO* est muté de façon bi-allélique. La corrélation du contenu en STLs avec la perception de l'amertume permet de confirmer que ces mutations provoquent une réduction de la quantité de STLs à des seuils suffisamment bas pour ne plus percevoir l'amertume. Cette réduction est d'autant plus marquée dans le cas de la double mutation des gènes *GAS-S1* et *GAS-S2*. Afin de réduire la quantité en STLs de génotypes plus adaptés à la sélection variétale, dans un but de produire des variétés de chicorée moins amères, la méthode d'édition CRISPR/Cas9 a été transférée aux composantes de chicorée ChicBitter003 à ChicBitter007. La méthode de transformation médiée par *R. rhizogenes* utilisée précédemment pour établir la preuve de concept, présente l'avantage d'avoir un taux d'efficacité de mutation élevé et permet d'obtenir des plantes rapidement. Cependant les plantes régénérées présentent des modifications phénotypiques importantes qui sont dues à l'insertion de l'ADN-T bactérien. Un nanisme est observé chez les plantes régénérées ainsi que le développement de chevelus racinaires réduisant la tubérisation de la racine de la chicorée. De plus, la comparaison du contenu en STLs entre les chicorées sauvages et les chicorées issues de chevelus racinaires montre que ces dernières accumulent plus de métabolites spécialisés. En raison de ces inconvénients, l'édition par CRISPR/Cas9 sur les composantes de chicorée ChicBitter003 à ChicBitter007 a été réalisée avec une autre méthode de transformation : la transfection de protoplastes. Cette méthode est plus longue (**Figure 3.1**) mais l'expression des gènes transfectés est transitoire et cela présente l'avantage de générer des plantes dont les modifications du phénotype ne seront dues qu'à la présence de mutations provoquées par CRISPR/Cas9.

Les protoplastes sont des cellules végétales sans paroi. Ils peuvent être isolés à partir de nombreuses espèces de plantes mais l'obtention de protoplastes viables en quantité suffisante dépend de multiples paramètres tels que le tissu à partir duquel les protoplastes sont isolés (feuilles, cotylédons, cals, etc.), l'âge de ce tissu, ou la solution de digestion enzymatique, notamment les concentrations d'enzymes utilisées pour digérer la paroi [Binding *et al.*, 1980 ; Sinha *et al.*, 2003 ; Davey *et al.*, 2010]. Par ailleurs les protoplastes n'ayant pas de paroi, ils sont sensibles aux changements osmotiques et aux chocs mécaniques, ce qui peut être une source de diminution de leur viabilité. Ces cellules végétales constituent un matériel privilégié pour le transfert direct de gènes puisque, sans

paroi, une perméabilisation temporaire de la membrane permet une intégration d'ADN. Cette capacité a permis le développement de systèmes d'expression transitoire pouvant être délivrés dans les protoplastes par transfection, via l'utilisation de plasmides ou, plus récemment, de complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Deux méthodes peuvent être utilisées pour ce transfert : par l'utilisation du PEG, ou par électroporation. Ainsi, depuis le développement des outils d'édition par CRISPR/Cas9, on compte de plus en plus d'articles utilisant la transfection de protoplastes pour réaliser l'édition de génome, de manière à générer des plantes mutantes sans transgène [Woo *et al.*, 2015 ; Andersson *et al.*, 2017 ; Andersson *et al.*, 2018 ; Lin *et al.*, 2018 ; De Bruyn *et al.*, 2020 ; Cankar *et al.*, 2021 ; Hsu *et al.*, 2021]. Le succès d'une édition de génome, par la méthode de transfection de protoplastes, dépend de plusieurs paramètres tels que la densité de protoplastes, la taille du système d'expression (plasmide, complexe RNP), les quantités de plasmide ou complexe RNP utilisées, ou des paramètres physico-chimiques de la méthode de perméabilisation [Hall *et al.*, 1996 ; Niedz *et al.*, 2003 ; Davey *et al.*, 2005 ; Woo *et al.*, 2015 ; Andersson *et al.*, 2017 ; Andersson *et al.*, 2018 ; Lin *et al.*, 2018 ; De Bruyn *et al.*, 2020 ; Cankar *et al.*, 2021 ; Hsu *et al.*, 2021].

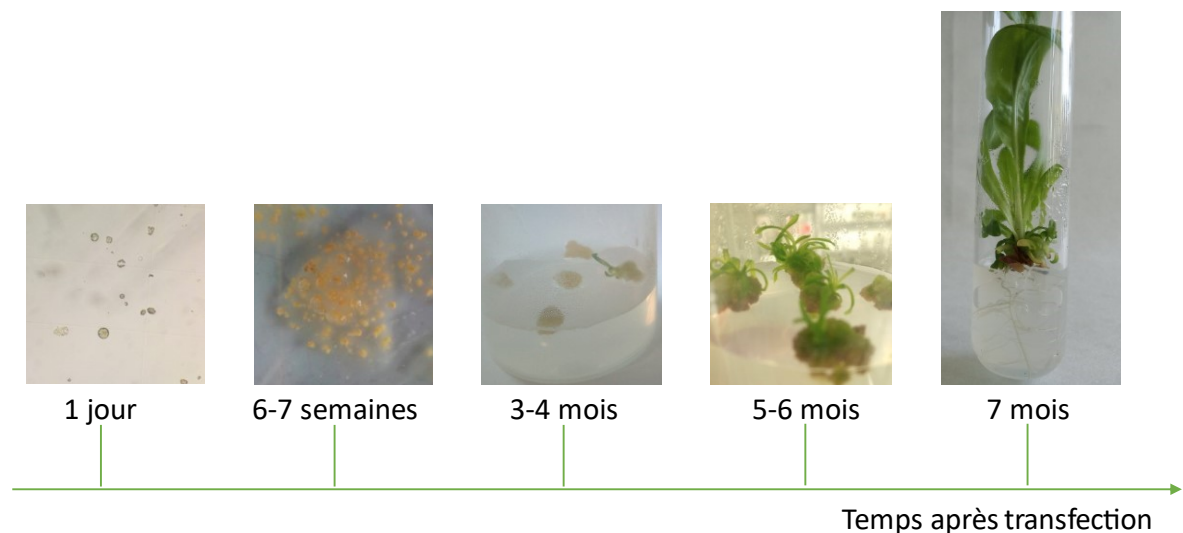


Figure 3.1. Processus de régénération de chicorée à partir de protoplastes.

Le dernier obstacle à la réussite d'une transfection de protoplastes, et sans doute le plus important, consiste à maîtriser la régénération de ce matériel végétal. Cette étape est aussi dépendante de plusieurs paramètres et nécessite du temps pour déterminer des conditions adaptées au matériel étudié. En effet, les besoins nutritionnels des protoplastes diffèrent d'une espèce végétale à une autre, et même si la plupart des milieux de régénération sont basés sur les formulations de Murashige et Skoog [1962] ou de Gamborg [1968], l'obtention de milieux de régénération optimaux nécessite une détermination empirique [Binding *et al.*, 1980 ; Rambaud *et al.*, 1990 ; Davey *et al.*, 2005]. Les nombreux travaux sur les protoplastes, cités ci-dessus, illustrent bien la diversité des

protocoles existant, parfois pour une même espèce, et les nombreux paramètres à prendre en compte lors de la mise en place d'une culture et d'une transfection de protoplastes.

Chez la chicorée, l'isolement des premiers protoplastes date de 1980 [Binding *et al.*, 1980] mais un arrêt de l'activité mitotique provoquait rapidement la mort des cellules. Ces travaux ont donné lieu au développement de méthodes pour augmenter la viabilité des protoplastes de chicorée mais aussi, améliorer la régénération des plantes à partir du mésophylle de chicorée [Crépy *et al.*, 1982 ; Saksi, 1985 ; Rambaud *et al.*, 1990]. Ces méthodes sont maintenant maîtrisées au sein du laboratoire et ont permis la mise au point de l'édition par CRISPR/Cas9 via la transfection de protoplastes par Bernard *et al.* [2019].

Afin de réaliser l'édition par CRISPR/Cas9 de matériel d'intérêt agronomique, via des protoplastes, une première étape a été de vérifier que les différentes composantes de chicorée ChicBitter003 à ChicBitter007 n'étaient pas récalcitrantes à la culture de protoplastes et qu'elles étaient capables de régénérer des plantes. Cette étape de vérification fera l'objet d'une première partie des résultats de ce chapitre. Ensuite, une optimisation du protocole de transfection a été réalisée. Cette optimisation avait pour but d'augmenter le taux de transfection des protoplastes, permettant ainsi à une plus grande quantité de plasmide d'être introduit. Ces expériences ont été complétées par les informations contenues dans la publication de De Bruyn *et al.* [2020] qui ont réalisé une édition par CRISPR/Cas9 médiée par transfection de protoplastes de chicorée et dont les taux de transfection variaient de 20% à 26%. Cette optimisation de protocole fera l'objet d'une seconde partie des résultats présentés dans ce chapitre. Finalement, une transfection des différentes composantes de chicorée a été entreprise avec le système d'édition par CRISPR/Cas9. Des mutants édités ont ainsi été générés pour au moins 2 composantes : ChicBitter003 et ChicBitter006. La caractérisation des séquences éditées a été entreprise mais il n'est pas encore possible d'analyser leur contenu métabolique afin de valider l'effet des mutations.

2. Matériel et Méthodes.

2.1. Matériel végétal.

Les graines de la chicorée ChicBitter001 et de 5 composantes de variétés de chicorée nommées ChicBitter003, Chicbitter004, Chicbitter005, Chicbitter006 et ChicBitter007, fournies par l'entreprise Florimond-Desprez, ont été utilisées pour l'ensemble des expériences de transfection de protoplastes. La chicorée ChicBitter001 a été utilisée comme témoin positif puisque c'est un génotype qui présente

des bons taux de régénération et qui a été utilisé pour la mise au point du protocole de transfection des protoplastes par Bernard *et al.* (2019). Une évaluation de la capacité des protoplastes à régénérer des cals a d'abord été réalisée avec les 5 composantes de chicorée, Chicbitter003 à Chicbitter007. L'édition par CRISPR/Cas9 des gènes impliqués dans la biosynthèse des STLs a ensuite été effectuée sur les composantes ChicBitter003, ChicBitter004 et ChicBitter006. Pour toutes ces expérimentations, de jeunes plantes *in vitro*, obtenues par semis aseptiques, sont utilisées. Les akènes sont stérilisés, semés et cultivés sur milieu S20 comme décrit précédemment [Rambaud *et al.*, 1990].

2.2. Matériel génétique.

Le plasmide GFP a été utilisé pour transférer les protoplastes de la chicorée ChicBitter001 et les protoplastes des composantes ChicBitter003, ChicBitter004 et Chicbitter006. L'expression de ce plasmide a permis de visualiser une fluorescence verte au microscope afin d'estimer le taux d'efficacité de transfection. Les plasmides pYLCRISPR-GASshort, pYLCRISPR-GASlong et pYLCRISPR-GAO ont été utilisés pour transférer les protoplastes de ChicBitter003, ChicBitter004 et ChicBitter006 afin d'éditer par CRISPR/Cas9 les gènes *GAS-S*, *GAS-L* et *GAO*. La construction de ces plasmides a déjà été décrite dans le chapitre 2.

2.3. Isolement et culture des protoplastes des 5 composantes de chicorée.

L'épiderme inférieur des feuilles de 24 vitroplants des composantes ChicBitter003 à Chicbitter007, âgés de 12 jours et issus de semis aseptiques, est retiré manuellement. Pour chaque composante, les feuilles sans épiderme sont incubées dans une solution de digestion enzymatique consistant en 10 mL de solution de lavage [Rambaud et Vasseur, 2001] additionnée de 10 mg/mL de cellulase Onozuka R-10 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays-Bas) et 5 mg/mL de macérozyme R-10 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays-Bas), durant une nuit à l'obscurité et à température ambiante. Les protoplastes sont ensuite filtrés à travers un tamis en inox (\varnothing maille 80 μ m), centrifugés à 200 g pendant 10 min et rincés 3 fois avec la solution de lavage [Rambaud et Vasseur, 2001]. Le dénombrement des protoplastes est effectué sur cellule de Nageotte et les protoplastes sont re-suspendus dans du milieu MC1 [Rambaud et Vasseur, 2001] de façon à obtenir 2.10^4 protoplastes/mL puis mis en culture dans des boîtes de Petri (\varnothing 55 mm) à 30°C et à l'obscurité. Après 7 jours, les protoplastes sont déposés, en goutte à goutte, sur des boîtes de Petri (\varnothing 90 mm) contenant du milieu MC2 solide [Rambaud et Vasseur, 2001], à raison de 1 mL de culture de protoplastes par boîte puis cultivés sous un cycle de 16h de lumière à 21 °C et 8h d'obscurité à 18 °C. Le taux d'efficacité de régénération de cals est estimé par le rapport entre le nombre de cals régénérés et le nombre de protoplastes mis en culture.

2.4. Transfection du plasmide GFP dans les protoplastes de ChicBitter001.

L'isolement des protoplastes de la chicorée Chicbitter001 a été réalisé comme décrit dans le paragraphe 2.3 ci-dessus. La transfection est réalisée selon le protocole publié par Bernard *et al.* [2019] avec quelques modifications. Lors du dénombrement des protoplastes sur cellule de Nageotte, les protoplastes sont incubés sur glace pendant 30 min puis centrifugés à 200 g pendant 5 min. La re-suspension des protoplastes est effectuée dans du milieu MMG (100 mM MgCl₂, 4 mM MES pH 5,7, 0,4 M mannitol) de façon à obtenir 4.10⁵, 6.10⁵ ou 8.10⁵ protoplastes/mL. La transfection des protoplastes est réalisée par ajout de 10, 30 ou 50 µg de plasmide GFP dans une solution de 300 µL de protoplastes et 330 µL de PEG4000 (30%, m/v). La solution de transfection est mélangée doucement par tapotement puis incubée à température ambiante pendant 15 min. L'arrêt du processus de transfection est réalisé par ajout progressif de 10 mL de solution de lavage puis centrifugation à 200 g pendant 5 min afin de retirer le surnageant. Les protoplastes transfectés sont re-suspendus dans 10 mL de milieu MC1 [Rambaud et Vasseur, 2001] et mis en culture comme décrit dans le paragraphe 2.3 ci-dessus.

2.5. Transfection des protoplastes des composantes de chicorées.

L'isolement et la transfection des protoplastes ont été réalisés selon le protocole publié par De Bruyn *et al.* [2020] avec quelques modifications. L'épiderme inférieur des feuilles de 36 vitroplants des composantes ChicBitter003, ChicBitter004 et Chicbitter006, âgés de 12 jours et issus de semis aseptiques, est retiré manuellement. Pour chaque composante, les feuilles sans épiderme sont incubées dans une solution de pré-plasmolyse P0 [Deryckere *et al.*, 2012] pendant 1h à température ambiante, puis transférées dans une solution de digestion enzymatique consistant en 10 mL de solution P0 additionnée de 5 mg/mL de cellulase Onozuka R-10 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays-Bas) et 1 mg/mL de macérozyme R-10 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Pays-Bas). La digestion est réalisée à l'obscurité pendant 16h, à température ambiante et sous agitation (25 rpm). Les protoplastes sont ensuite filtrés à travers un tamis en inox (Ø maille 80 µm), rincés 2 fois avec la solution MC2 [Rambaud et Vasseur, 2001] après centrifugation à 100 g pendant 10 min. Le dénombrement des protoplastes est effectué sur cellule de Nageotte et les protoplastes sont re-suspendus dans une solution MMG (100 mM MgCl₂, 4 mM MES pH 5,7, 0,4 M mannitol) de façon à obtenir 5.10⁵ protoplastes/mL. La transfection des protoplastes est réalisée par ajout de 10 µg de plasmide (pYLCRISPR-GASshort ou pYLCRISPR-GASlong ou pYLCRISPR-GAO) ou 10 µg de plasmide GFP, à une solution de 100 µL de protoplastes et 120 µL de PEG4000 (40% m/v, 0,4 M mannitol, 0,1 M Ca(NO₃)₂.4H₂O pH 6). La solution de transfection est mélangée doucement par tapotement puis

incubée 10 min à l'obscurité à température ambiante. L'arrêt du processus de transfection est réalisé par ajout de 600 µL de milieu W5 [De Bruyn *et al.*, 2020] suivi d'une centrifugation pendant 10 min à 80 g afin de retirer le surnageant. Les protoplastes transfectés sont re-suspendus dans 600 µL de milieu MC2, dénombrés de nouveau sur cellule de Nageotte et mis en culture à 30°C, à l'obscurité dans le milieu MC1 à raison de 2.10⁴ protoplastes / mL. La prolifération des cals et la régénération des plantes ont été réalisées comme décrit précédemment [Rambaud et Vasseur, 2001].

2.6. Génotypage des plantes éditées et séquençage des mutants.

Les ADN des plantes éditées et régénérées à partir des protoplastes de Chicbitter003 et ChicBitter006 sont extraits via le kit NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon le protocole du fabricant. Les potentielles mutations sont détectées par génotypage suite à l'amplification des régions cibles des gènes *GAS-S*, *GAS-L* ou *GAO*, par des paires d'amorces marquées (S1, S2, S3, S5, GAO et LF, **Tableau 3.1**). L'amplification par PCR est réalisée dans un volume de 15 µL (1X de tampon PCR avec 2 mM MgCl₂, 100 µM de chaque dNTP, 0,2 mg/mL BSA, 133 nM de chaque amorce, 0,3 U de Taq polymérase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et 2 ng d'ADN) et selon une procédure TouchDown : 5 min de dénaturation à 94 °C suivi de (a) 5 cycles de 30 sec à 94 °C, 30 sec à 60 °C (-1 °C par cycle), 30 sec à 72°C, et (b) 35 cycles de 30 sec à 94 C, 30 sec à 55 °C, 30 sec à 72 °C, puis 1 cycle d'élongation de 10 min à 72 °C. Les produits PCR sont analysés sur un séquenceur capillaire 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Les données de génotypage sont collectées et analysées par le logiciel GeneMapper Software v3.5. Les séquences de gènes sont obtenues par séquençage Sanger en utilisant les mêmes amorces que pour le génotypage (GATC service, Eurofins Genomics, Ebersberg, Allemagne).

Tableau 3.1. Liste des amorces utilisées pour le génotypage et le séquençage.

| Nom | Sens | Séquence 5'-3' |
|-----|---------|------------------------------|
| S1 | Forward | AGAATCTATTAATCGGCTTT |
| | Reverse | [HEX] TAAGGATCATCGCTTAATTA |
| S2 | Forward | [HEX] CCCAGAATCTATTAATTGGT |
| | Reverse | AAGTTAGGTTATTTCCGTTG |
| S3 | Forward | [6-FAM] AATGATTACTCCGTTTAGT |
| | Reverse | TTCCGATTTCTTAATACTGA |
| S5 | Forward | [6-FAM] GTTCTCGTGCATTATACTTG |
| | Reverse | ACCTCCCCTATGTATGTAT |
| GAO | Forward | [HEX] TCACTACTTCCATTGCTCT |
| | Reverse | ACTCTCTTTGATCCTTGATT |
| LF | Forward | [6-FAM] CAGAAGTCTCACAAGTCCT |
| | Reverse | CTTGCATCATTCCTACTATC |

3. Résultats

3.1. Efficacité de callogénèse des 5 composantes de chicorées.

Le principal objectif de ce chapitre est de réaliser l'édition par CRISPR/Cas9 dans les protoplastes des différentes composantes de chicorée ChicBitter003 à ChicBitter007. Ainsi, il est important de vérifier la capacité de régénération de ces composantes avant la réalisation de travaux supplémentaires. Pour cela, des cultures de protoplastes issues des composantes ChicBitter003 à ChicBitter007 et de la chicorée ChicBitter001 ont été réalisées et comparées. Ces comparaisons sont effectuées en prenant en compte l'efficacité de callogénèse, c'est-à-dire, le nombre de cals formés en fonction du nombre de protoplastes mis en culture. En effet, lors de la régénération de plantes à partir de protoplastes, l'induction de cals constitue une étape limitante. La réussite de cette étape est nécessaire pour l'obtention de bourgeons chez la chicorée. Le **tableau 3.2** montre, d'une part, que la composante ChicBitter004 présente une efficacité de callogénèse quasi-similaire à la chicorée ChicBitter001, et d'autre part, que les composantes ChicBitter003 et ChicBitter006 sont celles qui présentent l'efficacité la plus élevée avec des taux de 2,6% et 1,9% respectivement. Ces 3 composantes ont donc été utilisées pour la réalisation de l'édition par CRISPR/Cas9.

Tableau 3.2 : Représentation de l'efficacité de callogénèse des protoplastes en fonction de différentes chicorées.

| Matériel | Nombre de cals | Efficacité de callogénèse |
|---------------|----------------|---------------------------|
| ChicBitter001 | 193 | 0,9% |
| ChicBitter003 | 529 | 2,6% |
| ChicBitter004 | 177 | 0,8% |
| ChicBitter005 | 44 | 0,2% |
| ChicBitter006 | 395 | 1,9% |
| ChicBitter007 | 13 | 0,06% |

L'efficacité de callogénèse est calculée par le nombre de cals formés divisé par le nombre de protoplastes mis en culture ($2 \cdot 10^4$ protoplastes par boîte de Petri)

3.2. Optimisation de la transfection de protoplastes.

Une optimisation du protocole de transfection a été réalisée en vue d'améliorer le protocole mis en place au sein du laboratoire par Bernard *et al.* [2019]. Cette optimisation a été réalisée sur des

protoplastes de la chicorée ChicBitter001. L'évaluation de l'efficacité de transfection a été possible grâce à l'expression du gène de la GFP introduit dans les protoplastes (**Figure 3.2**).

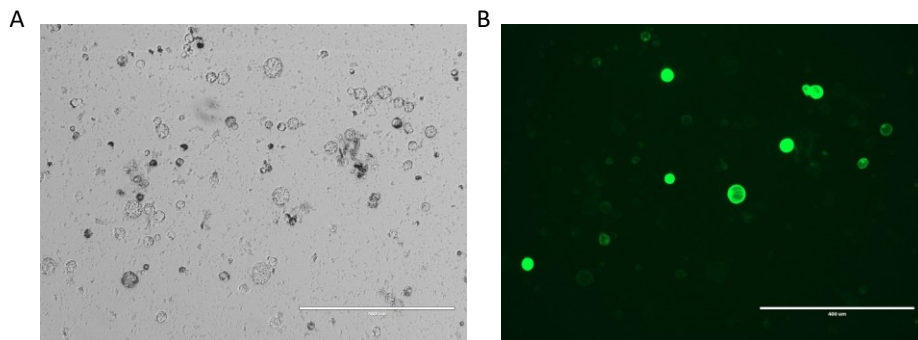


Figure 3.2. Visualisation de protoplastes sous microscope à fluorescence. A) Protoplastes observés en lumière visible. B) Protoplastes émettant une fluorescence après transfection avec le plasmide GFP (λ d'émission max = 504 nm).

Le 1^{er} paramètre étudié est la concentration de protoplastes utilisée pendant la transfection. Dans le protocole mis en place au sein du laboratoire, la concentration préconisée était de 6.10^5 protoplastes/mL. Une analyse de l'effet d'une concentration plus haute (8.10^5 protoplastes/mL) ou plus basse (4.10^5 protoplastes/mL) a été effectuée et les résultats sont reportés **Figure 3.3, Cadre A**. Bien qu'aucune différence significative ne soit observable, l'efficacité de transfection semble plus élevée pour les concentrations de 6.10^5 et 8.10^5 protoplastes /mL (**Figure 3.3, Cadre A**). La suite de l'optimisation s'est donc effectuée avec ces deux concentrations.

Le 2^{ème} paramètre étudié est la quantité de plasmide utilisée pour la transfection. Le protocole mis en place au sein du laboratoire préconise une quantité de 30 μ g de plasmide, ajoutée à une solution de 300 μ L de protoplastes et 330 μ L de PEG (30%). L'analyse de l'effet d'une quantité plus basse (10 μ g) ou plus haute (50 μ g) de plasmide a été effectuée pour une concentration de protoplastes de 8.10^5 protoplastes/mL (**Figure 3.3, Cadre B**) et de 6.10^5 protoplastes/mL (**Figure 3.3, Cadre C**). Le pourcentage de transfection avoisinant les $7 \pm 5\%$ pour les deux tests réalisés, on considère que la quantité de plasmide n'influence pas l'efficacité de transfection. Pour la suite des expérimentations, la quantité de 10 μ g de plasmide a été utilisée dans l'optique de diminuer les coûts et le temps de production de ces plasmides.

Suite à de premiers essais infructueux pour l'augmentation significative de l'efficacité de transfection, un article concernant la transfection de protoplastes de chicorée pour l'édition de gènes du métabolisme des STLs a été publié par une équipe concurrente belge [De Bruyn *et al.* 2020]. Dans cette étude, le taux de transfection des protoplastes était compris entre 20 et 26%. En comparant le protocole mis au point par Bernard *et al.* [2019] et le protocole proposé par De Bruyn *et al.* [2020],

utilisant chacun 2 concentrations différentes de PEG (30 et 40% respectivement), le taux de transfection est amélioré avec le protocole de De Bruyn *et al.* [2020] (**Figure 3.3, Cadre D**). Le protocole de transfection adapté de De Bruyn *et al.* [2020] a donc été utilisé pour la suite de nos travaux.

Les composantes ChicBitter003, ChicBitter004 et ChicBitter006 étant les composantes de chicorée avec le meilleur taux de callogénèse, des transfactions avec le plasmide GFP, et suivant le protocole de De Bruyn *et al.* [2020], ont été réalisées sur les protoplastes de ces composantes afin de vérifier leur capacité à être transfectées (**Figure 3.4**). Au total, 3 expériences de transfection distinctes ont été réalisées pour chacune des composantes. Ces transfactions de plasmide GFP ont eu lieu en parallèle de la transfection des plasmides permettant l'édition par CRISPR/Cas9, et dont les résultats seront présentés dans les paragraphes suivants. Le taux de transfection obtenu pour les protoplastes des différentes composantes est compris entre 7 et 20 % pour ChicBitter003 et ChicBitter006 et, est de $24 \pm 2\%$ pour la composante ChicBitter004 (**Figure 3.4**). La différence observée entre les différentes composantes pourrait être due à 2 éléments : le manipulateur qui a effectué les expériences de transfection et le nombre de transfactions totales effectuées lors de chacune des expérimentations. Dans l'ensemble, les résultats permettent de confirmer que les 3 composantes choisies sont capables d'être transfectées avec une efficacité semblable, voire supérieure, à ChicBitter001.

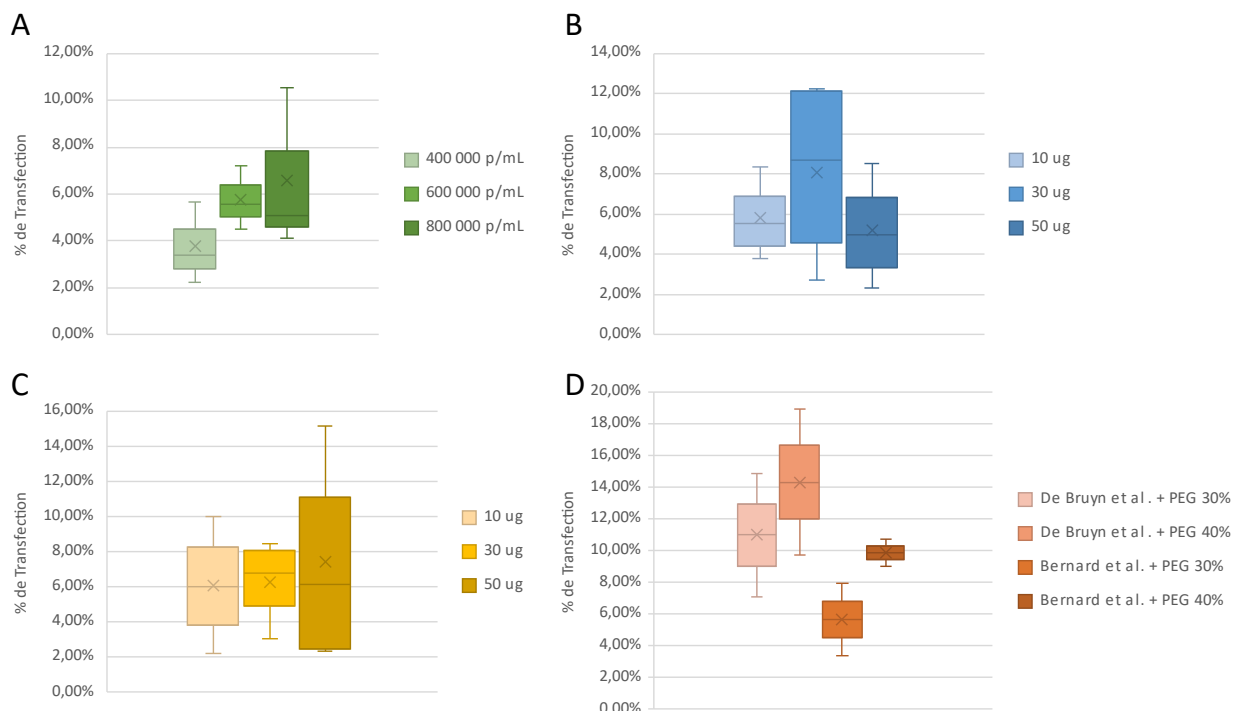


Figure 3.3. Rendement des essais d'optimisation de transfection de protoplastes issus de la composante Chicbitter001. Le taux de transfection est estimé sur 3 expériences distinctes pour chacun des paramètres testés. Ce taux correspond au dénombrement des protoplastes ayant intégré le plasmide GFP sur le nombre de protoplastes total. A) Effet de la densité de protoplastes (en protoplastes / mL) sur la transfection ; B) effet de la concentration de plasmide

pour une transfection à 8.10^5 p/mL ; C) effet de la concentration de plasmide pour une transfection à 6.10^5 p/mL ; D) Comparaison des protocoles de De Bruyn *et al.* [2020] et de Bernard *et al.* [2019].

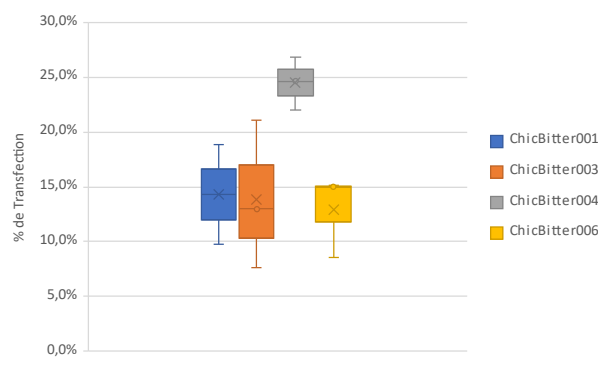


Figure 3.4. Efficacité de transfection dans les différentes composantes de chicorée. Le taux de transfection est estimé sur 3 expériences distinctes pour chacune des composantes testées. Ce taux correspond au dénombrement des protoplastes ayant intégré le plasmide GFP sur le nombre de protoplastes total.

3.3. Edition des gènes *GAS* et *GAO* par transfection de protoplastes issus de ChicBitter003.

Les travaux d'édition par CRISPR/Cas9 sur des protoplastes ont débuté sur la composante ChicBitter003 puisqu'elle présente le taux d'efficacité de callogénèse le plus élevé et donc permettra de régénérer plus de bourgeons.

Pour les protoplastes transfectés avec le plasmide pYLCRISPR-GASshort, ciblant les différentes copies du gène *GAS-S*, 86 plantes ont été régénérées et analysées. Le génotypage a identifié 27 plantes potentiellement mutantes mais l'analyse par séquençage Sanger n'a permis de confirmer que 5 plantes mutantes, représentant une efficacité de mutation de 5,8% (**Tableau 3.3**). L'analyse des séquences des 5 plantes mutées a permis d'identifier : 1 plante mutée uniquement sur la copie *GAS-S1*, 1 plante mutée uniquement sur la copie *GAS-S2*, 2 plantes mutées à la fois sur la copie *GAS-S1* et *GAS-S2* et 1 plante mutée simultanément sur les copies *GAS-S1*, *GAS-S2* et *GAS-S5* (**Tableau 3.3, Figure 3.5**). La plante présentant une mutation uniquement sur la copie *GAS-S1* (*GAS_P3*) est bi-allélique hétérozygote (**Figure 3.5**), signifiant que ces deux allèles sont mutés de façon différente. La plante mutée uniquement sur la copie *GAS-S2* (*GAS-S_P5*) est mono-allélique (**Figure 3.5**), signifiant qu'un seul allèle est muté. Cette plante *GAS-S_P5* présente une délétion de 9 nucléotides, or, des délétions ou ajouts de 3 nucléotides, ou d'un multiple de 3, ne provoquent pas de changement de cadre de lecture. La protéine formée à partir de l'expression de cette copie ne sera donc pas tronquée et pourrait continuer à exercer sa fonction. Cette plante aurait donc un phénotype de plante non éditée. Parmi les 2 plantes mutées simultanément sur les copies *GAS-S1* et *GAS-S2*, l'une (*GAS-S_P1*) est bi-allélique hétérozygote pour la copie *GAS-S1* et bi-allélique homozygote pour la copie *GAS-S2* (**Figure**

3.5), l'autre (GAS-S_P4) est mono-allélique pour la copie GAS-S1 et bi-allélique homozygote pour la copie GAS-S2 (Figure 3.5). La plante GAS-S_P2 est mutante bi-allélique pour chacune des copies GAS-S1, GAS-S2 et GAS-S5. Cependant pour la copie GAS-S5, l'un de ses allèles présente une délétion de 9 nucléotides (Figure 3.5), signifiant que seul l'un des allèles de cette copie présentera un décalage de lecture.

Pour les protoplastes transfectés avec le plasmide pYLCRISPR-GASlong, ciblant la forme longue du gène GAS, 159 plantes ont été régénérées et analysées. Le génotypage a identifié 11 plantes potentiellement mutantes dont seulement 4 ont été confirmées par séquençage Sanger, ce qui représente une efficacité de mutation de 2,5% (Tableau 3.3). L'analyse des séquences a permis d'identifier que 3 plantes étaient mutantes mono-alléliques (GAS-L_P1, GAS-L_P2 et GAS-L_P3) et 1 plante était mutante bi-allélique hétérozygote (GAS-L_P4) (Figure 3.6). L'analyse a aussi montré que chacune des mutations sont capables de provoquer un décalage du cadre de lecture.

| | Target 1 | PAM | PAM | Target 2 | T1/T2 |
|------------|-------------------------|-------------------------|--|-------------------------------|--------|
| GAS-S1 | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | GAS-S_P1.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | ----- (...) | GGGGATGCCAATGGTTGAGG | -54 |
| | GAS-S_P1.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTC | ----- (...) | GGGGATGCCAATGGTTGAGG | -55 |
| | GAS-S_P2.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | ----- (...) | GGGGATGCCAATGGTTGAGG | -54 |
| | GAS-S_P2.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTC | ----- (...) | GGGGATGCCAATGGTTGAGG | -55 |
| | GAS-S_P3.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATC ----- AATGGTTGAGG | WT/-10 |
| | GAS-S_P3.2 | AAGAGTGT ----- | ----- (...) | AGGGGATGCCAATGGTTGAGG | -65 |
| | GAS-S_P4.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| GAS-S_P4.2 | AAGAGTGTAGTAAACACT | ----- (...) | GGGGATGCCAATGGTTGAGG | -56 | |
| GAS-S2 | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| | GAS-S_P1.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATC ----- GCCAATGGTTGAGG | WT/-7 |
| | GAS-S_P1.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATC ----- GCCAATGGTTGAGG | WT/-7 |
| | GAS-S_P2.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATC ----- GCCAATGGTTGAGG | WT/-7 |
| | GAS-S_P2.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATC ----- GCCAATGGTTGAGG | WT/-7 |
| | GAS-S_P4.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | <u>GATGGAATG</u> (...) <u>TGCCTTC</u> ----- | GATGCCAATGGTTGAGG | +52/-5 |
| | GAS-S_P4.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | <u>GATGGAATG</u> (...) <u>TGCCTTC</u> ----- | GATGCCAATGGTTGAGG | +52/-5 |
| | GAS-S_P5.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT/WT |
| GAS-S_P5.2 | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCA ----- AATGGTTGAGG | WT/-9 | |
| GAS-S5 | WT | AAGAGTGTAGTAAACACTCTCGA | <u>AGG</u> CAA (...) | ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | WT |
| | GAS-S_P2.1 | AAGAGTGTAGTAAACACTCT | <u>TCGA</u> <u>AGG</u> CAA (...) ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | | +1 |
| | GAS-S_P2.2 | AAGAGTGTAGTA ----- | <u>GA</u> <u>AGG</u> CAA (...) ATTCCATCAGGGGATGCCAATGGTTGAGG | | -9 |

Figure 3.5. Séquences des copies du gène GAS-S des plantes mutées et régénérées des protoplastes de la composante ChicBitter003. Les séquences cibles sont en bleu et les motifs PAM sont soulignés. Les mutations sont en rouge et les changements dans la séquence sont indiqués à droite de chaque séquence. GAS-S_Px.x : Plante x, allèle x ; WT : sauvage ; Target 1 : 1^{ère} cible ; Target 2 : 2^{ème} cible ; + : insertion ; - : délétion

| | PAM | Target 1 | Target 2 | PAM | T1/T2 |
|------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------|-----------|
| WT | CAG <u>CCC</u> | <u>CCGACCGTTGTCTGTCCA</u> ACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | WT/WT |
| GAS-L_P1.1 | CAG <u>CCC</u> | <u>CCGACCGTTGTCTGTCCA</u> ACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | WT/WT |
| GAS-L_P1.2 | CAG <u>CCC</u> | <u>CCGACCGTTGTCTGTCCA</u> ACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | +1/WT |
| GAS-L_P2.1 | CAG <u>CCC</u> | <u>CCGACCGTTGTCTGTCCA</u> ACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | WT/WT |
| GAS-L_P2.2 | CAG <u>CCC</u> | <u>CCGACCGTTGTCTGTCCA</u> ACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | +1/WT |
| GAS-L_P3.1 | CAG <u>CCC</u> | <u>CCGACCGTTGTCTGTCCA</u> ACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | WT/WT |
| GAS-L_P3.2 | CAG <u>CCC</u> | <u>CCGACCGTTGTCTGTCCA</u> ACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | +1/WT |
| GAS-L_P4.1 | CAG <u>CCC</u> CCG | - - - - - TCTGTCCAACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | -7/WT |
| GAS-L_P4.2 | CAG <u>CCC</u> | CCGATCCGTTGTCTGT <u>C</u> ACCGA (...) | TGG <u>CCA</u> ACTTCCACCTTCGATC | <u>TGGG</u> GCT | SNP,-1/WT |

Figure 3.6. Séquences du gène *GAS-L* des plantes mutées et régénérées de protoplastes de la composante ChicBitter003. Les séquences cibles sont en bleu et les motifs PAM sont soulignés. Les mutations sont en rouge et les changements dans la séquence sont indiqués à droite de chaque séquence. GAS-L_Px.x : Plante x, allèle x ; WT : sauvage ; Target 1 : 1^{ère} cible ; Target 2 : 2^{ème} cible ; + : insertion ; - : délétion.

Pour les protoplastes transfectés avec le plasmide pYLCRISPR-GAO, ciblant le gène *GAO*, 144 plantes ont été régénérées et analysées. Le génotypage a identifié 41 plantes potentiellement mutantes et le séquençage Sanger a permis d'en confirmer 17, représentant une efficacité de mutation de 11,8% (**Tableau 3.3**). Parmi les 17 plantes séquencées, 2 plantes ont montré une édition du gène *GAO* résultant en une délétion de 3 nucléotides ou d'un multiple de 3. Ce type de délétion ne provoquant pas de changement de cadre de lecture, la protéine *GAO* formée ne sera pas tronquée et continuera, sans doute, à exercer sa fonction. Pour cette raison, on peut considérer que ces deux plantes auront un phénotype de plante non éditée. L'analyse des séquences des 15 plantes restantes a montré que 4 plantes (*GAO_P3*, *GAO_P12*, *GAO_P14* et *GAO_P15*) sont des mutants mono-alléliques (**Figure 3.7**) et que les 11 autres sont des mutants bi-alléliques, dont 2 plantes mutantes sont bi-alléliques homozygotes : les plantes *GAO_P5* et *GAO_P6* (**Figure 3.7**).

Tableau 3.3. Aperçu des événements de mutation induits par CRISPR/Cas9 dans les protoplastes de la composante ChicBitter003.

| Gènes ciblés | <i>GAS-S</i> | <i>GAS-L</i> | <i>GAO</i> | Total |
|---|--------------|--------------|------------|-------|
| Nombre de plantes régénérées | 86 | 159 | 144 | 389 |
| Nombre de plantes génotypées | 86 | 159 | 144 | 389 |
| Plantes potentiellement mutantes | 27 | 11 | 41 | 72 |
| Nombre de plantes mutantes identifiées par Sanger | 5 | 4 | 17 | 26 |
| Efficacité de mutation | 5,8% | 2,5% | 11,8% | 6,7% |

L'efficacité de mutation est calculée par la division du nombre de plantes mutantes par le nombre de plantes régénérées.

| | PAM | Target 1 | PAM | Target 2 | T1/T2 | |
|-----------|----------------|--------------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------|---------|
| WT | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/WT | |
| GAO_P1.1 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- ATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | ----- ATCGCGACTCCCAA | -7/-8 | |
| GAO_P1.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- CAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC ----- GCGACTCCCAA | -10/-9 | |
| GAO_P2.1 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- ATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | ----- ATCGCGACTCCCAA | -7/-8 | |
| GAO_P2.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- CAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC ----- GCGACTCCCAA | -10/-9 | |
| GAO_P3.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/WT | |
| GAO_P3.2 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>C</u> | ----- ATCGCGACTCCCAA | WT/-10 | |
| GAO_P4.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCG <u>G</u> TCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | +1/WT | |
| GAO_P4.2 | TCG <u>CCA</u> | CTCG ----- CCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | -8/WT | |
| GAO_P5.1 | TCG <u>CCA</u> | CT ----- ACAAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC -- AGGCATCGCGACTCCCAA | -13/-2 | |
| GAO_P5.2 | TCG <u>CCA</u> | CT ----- AAAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC -- AGGCATCGCGACTCCCAA | -13/-2 | |
| GAO_P6.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC -- AGGCATCGCGACTCCCAA | WT/-2 | |
| GAO_P6.2 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC -- AGGCATCGCGACTCCCAA | WT/-2 | |
| GAO_P7.1 | TCG <u>CCA</u> | CTC --- CCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC -- AGGCATCGCGACTCCCAA | -3/-2 | |
| GAO_P7.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- AATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAAGAGGCATCGCGACTCCCAA | -6/+1 | |
| GAO_P8.1 | TCG <u>CCA</u> | CTC --- CAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC ----- TCGCGACTCCCAA | -4/-7 | |
| GAO_P8.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- TCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC -- AGGCATCGCGACTCCCAA | -8/-2 | |
| GAO_P9.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCG ----- AAAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | -11/WT | |
| GAO_P9.2 | TCG <u>CCA</u> | CTTGGCGACCC ----- | ACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC ----- GCGACTCCCAA | +9-4/-9 |
| GAO_P10.1 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- AACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCC -- AGGCATCGCGACTCCCAA | -11/-2 | |
| GAO_P10.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- CAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TC ----- ATCGCGACTCCCAA | -10/-7 | |
| GAO_P11.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/SNP | |
| GAO_P11.2 | TCG <u>CCA</u> | CTC ----- CAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | -10/WT | |
| GAO_P12.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/SNP | |
| GAO_P12.2 | TCG <u>CCA</u> | C ----- CCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | -11/WT | |
| GAO_P13.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/WT | |
| GAO_P13.2 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAG -- GCATCGCGACTCCCAA | WT/-2 | |
| GAO_P14.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/WT | |
| GAO_P14.2 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | T ----- GGCATCGCGACTCCCAA | WT/-5 | |
| GAO_P15.1 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCAGAGGCATCGCGACTCCCAA | WT/WT | |
| GAO_P15.2 | TCG <u>CCA</u> | CTCGTCCCAAATCCAACAAA | AAGCG <u>CCT</u> | TCCA ----- ATCGCGACTCCCAA | WT/-5 | |

Figure 3.7. Séquences du gène GAO des plantes mutées et régénérées de protoplastes de la composante ChicBitter003. Les séquences cibles sont en bleu et les motifs PAM sont soulignés. Les mutations sont en rouge et les changements dans la séquence sont indiqués à droite de chaque séquence. GAO_Px.x : Plante x, allèle x ; WT : sauvage ; Target 1 : 1^{ère} cible ; Target 2 : 2^{ème} cible ; + : insertion ; - : délétion.

3.4. Edition des gènes GAS et GAO par transfection de protoplastes issus de ChicBitter004 et ChicBitter006.

Les travaux d'édition par CRISPR/Cas9 ont continué sur des protoplastes de la composante ChicBitter006. La récente régénération de ces plantes a permis de commencer la recherche de mutations par génotypage mais encore peu de plantes ont été régénérées et analysées (**Tableau 3.4**).

Sur les 10 plantes régénérées et analysées et ayant été transfectées avec le plasmide ciblant le gène *GAO*, le génotypage n'a permis d'identifier qu'une seule plante potentiellement mutante. Le même nombre de mutants potentiels est retrouvé lors du génotypage des 22 plantes régénérées et ayant reçu le plasmide ciblant le gène *GAS-L*. Pour la transfection ciblant les copies du gène *GAS-S*, il semblerait que 12 des 13 plantes analysées soient potentiellement mutantes. Néanmoins, ces résultats n'ayant pas encore été confirmés par séquençage Sanger, aucune conclusion ne peut être émise pour le moment.

Tableau 3.4. Aperçu des événements de mutation induits par CRISPR/Cas9 dans les protoplastes de la composante ChicBitter006.

| Gènes ciblés | <i>GAS-S</i> | <i>GAS-L</i> | <i>GAO</i> | Total |
|----------------------------------|--------------|--------------|------------|-------|
| Nombre de plantes régénérées | 13 | 2 | 10 | 45 |
| Nombre de plantes génotypées | 13 | 22 | 10 | 45 |
| Plantes potentiellement mutantes | 12 | 1 | 1 | 14 |

Enfin, des travaux d'édition par CRISPR/Cas9 sur des protoplastes issus de la composante ChicBitter004 ont aussi été entrepris mais très peu de résultats ont été obtenus puisque seuls des cals ont pu être régénérés pour le moment.

4. Discussion

L'utilisation de la transfection de protoplastes pour l'édition du génome par CRISPR/Cas9 apparaît à l'heure actuelle comme une technologie de choix pour régénérer des plantes mutantes sans transgène. Afin de mettre en place cette technologie, de nombreux paramètres sont à prendre en compte, pour l'isolement, la transfection et la culture de protoplastes. Au sein de notre laboratoire, les méthodes de culture et de régénération de protoplaste sont complètement maîtrisées, mais la méthode de transfection pour l'édition par CRISPR/Cas9 mise au point présentait une efficacité relative.

Pour augmenter l'efficacité de mutation par CRISPR/Cas9, des essais ont été entrepris dans le but de permettre l'introduction d'un plus grand nombre de plasmides dans les protoplastes. L'adoption du protocole de transfection publié par De Bruyn *et al.* [2020] a permis une augmentation significative du taux de transfection des protoplastes. Cette amélioration pourrait être due aux changements de plusieurs paramètres tels que la réalisation d'une pré-plasmolyse avant traitement enzymatique, la concentration d'enzyme utilisée, la densité de protoplastes à transfecter, ou la

concentration de PEG utilisée à un pH ajusté, mais c'est probablement l'ensemble de ces facteurs qui a permis cette amélioration. En utilisant le protocole publié par De Bruyn *et al.* [2020], des transfections ont aussi été réalisées avec les protoplastes des composantes ChicBitter003, ChicBitter004 et ChicBitter006, en raison de leurs taux de régénération de cals plus élevés. Le taux de transfection des protoplastes des différentes composantes est compris entre 7 et 20 % pour ChicBitter003 et ChicBitter006 et, est de $24 \pm 2\%$ pour la composante ChicBitter004. L'étude sur laquelle s'appuie le protocole de transfection de protoplastes utilisé pour le projet rapportant un taux de transfection entre 20 % et 26 % [De Bruyn *et al.*, 2020], on peut estimer que l'adaptation de ce protocole est réussie malgré quelques variations. Lors de l'application de ce protocole sur les protoplastes de composante, il a été observé que plus le nombre de transfections réalisées lors d'une expérience était important, moins le taux de transformation avec le plasmide GFP était élevé. Il est possible de supposer que le temps de contact avec les différentes solutions telles que la solution de PEG influencera la qualité de la transfection ou la viabilité des protoplastes, diminuant ainsi le taux de transfection. Cela pourrait expliquer les différences de taux observées entre les différentes composantes.

Comme prédit par l'analyse de variabilité des séquences cibles entre les différentes composantes de chicorées utilisées pour l'édition par CRISPR/Cas9 et décrite dans le chapitre 1, les premiers résultats du séquençage Sanger ont permis de confirmer que les plasmides utilisés pour l'édition par CRISPR/Cas9 sont efficaces. Des plantes éditées ont ainsi été générées mais le nombre définitif n'a pas encore pu être estimé puisque de nombreuses plantes restent encore à analyser. L'édition par CRISPR/Cas9 réalisée dans les protoplastes de ChicBitter003 a permis l'obtention d'un taux d'efficacité de mutation total de 6,7%, ce qui est éloigné de celui obtenu par De Bruyn *et al.* [2020] (30,23% pour l'ensemble des gènes *GAS-S* et *GAO*). Ces différences entre nos données et les données de De Bruyn *et al.* [2020] peuvent être dues aux cibles définies pour l'édition par CRISPR/Cas9, qui présentent plus ou moins d'efficacité, ou aux différents vecteurs d'expression utilisés. En effet, les plasmides utilisés dans nos travaux ne sont pas de la même taille que ceux utilisés par De Bruyn *et al.* [2020]. Dans une autre étude, publiée par Cankar *et al.* [2021], une édition par CRISPR/Cas9 des gènes *GAS-S* et *GAS-L* a été réalisée dans des protoplastes de chicorée. Cependant, seules les plantes éditées sont présentées dans cet article et aucune donnée sur le nombre de plantes total régénérées ou sur le taux d'efficacité de mutation n'est mentionnée. Ce manque d'information ne permet donc pas de comparer avec nos résultats.

Des limites à la méthode de transformation médiée par *R. rhizogenes* ont pu être mises en évidence telles que le faible nombre de mutants régénérées à partir de chevelus racinaires, l'aspect

génotype-dépendant observé pour la composante ChicBitter003 mais aussi des changements phénotypiques dus à l'insertion des ADN-T dans les plantes. L'utilisation de la transfection de protoplastes permet de contourner ces difficultés par l'obtention de nombreux vitroplants, facilement multipliables *in vitro*, que l'on pourra cultiver en serre S2 afin d'analyser leur contenu en STLs. Les plantes générées sont aussi exemptes de transgène même si quelques études ont montré que des fragments plasmidiques pouvait être retrouvés dans le génome [Bernard *et al.*, 2019 ; De Bruyn *et al.*, 2020 ; Cankar *et al.*, 2021]. La détection de ces fragments interroge sur l'insertion de parties de gènes issues du plasmide ou sur l'insertion du plasmide entier. Dans le second cas, cela pourrait signifier la présence du gène *cas9* dans le génome des plantes régénérées qui pourrait, potentiellement, continuer à être exprimé et exercer son action. Dans le cadre des travaux présentés dans ce chapitre, la vérification de la présence de fragments du gène *cas9* est prévue. L'insertion d'autres gènes, présents sur le plasmide utilisé pour la transfection, sera aussi recherchée afin de déterminer si le plasmide entier s'est intégré dans le génome de nos plantes. Pour pallier l'insertion de ces fragments plasmidiques, il serait intéressant d'utiliser des complexes ribonucléoprotéiques, consistant en un assemblage de sgRNA et de protéine Cas9, pour la transfection de protoplastes médiée par PEG.

Les travaux réalisés dans ce chapitre ont permis de montrer que les plasmides utilisés pour l'édition par CRISPR/Cas9 sont aussi bien utilisables lors d'une transformation médiée par *R. rhizogenes* que lors d'une transfection de protoplastes médiée par PEG, et permettent la génération de plantes éditées. Les travaux réalisés sur les protoplastes sont encore en cours puisque de nombreuses plantes n'ont pas encore été séquencées. Néanmoins, il a été possible d'obtenir de nombreux mutants différents tels que des mutants pour le gène *GAS-L*, ce qui n'avait pas été possible pour la chicorée ChicBitter002, ainsi que des double et triple mutants. Cela va permettre de compléter la première étude utilisant la transformation par *R. rhizogenes* en confirmant ou en infirmant les résultats. Ces travaux vont aussi permettre d'apporter des informations supplémentaires sur l'implication des différents gènes ou copies de gènes dans la production de STLs et permettront peut-être de répondre à de nombreuses questions telles que : la copie *GAS-S5* est-elle exprimée ? les copies *GAS-S1* et *GAS-S2* sont-ils les seuls gènes importants pour la production de STLs ? quels sont les rôles de la copie *GAS-S3* et du gène *GAS-L* ? La réponse à ces questions et l'amélioration de la connaissance du métabolisme des STLs sont d'un grand intérêt pour les sélectionneurs puisqu'ils pourront se focaliser sur certains gènes plutôt que sur d'autres pour la sélection assistée par marqueurs, dans le but de créer des variétés de chicorée moins amères.

Les 5 composantes Chicbitter003 à ChicBitter007 ont pour but d'être inter-croisées afin de former 2 variétés différentes. En général, une variété est obtenue en mélangeant 3 composantes donc

la mutation d'une ou deux composantes par variété permettrait de diminuer significativement le contenu en STLs de la variété. Il apparaît alors logique de commencer à muter les composantes les plus riches en STLs. Dans le chapitre 1, le contenu en STLs total des différentes composantes avait été évalué dans des racines âgées de 3 mois (**Figure 1.10**). Les résultats ont montré que la composante ChicBitter007 est la plus riche en STLs mais c'est aussi celle qui présente le plus mauvais taux de régénération de cals (**Tableau 3.2**). Les composantes ChicBitter003, ChicBitter004 et ChicBitter006 utilisées pour l'édition par CRISPR/Cas9 dans ce chapitre présentent des bons taux de régénération (**Tableau 3.2**), un contenu moyen en STLs par rapport aux deux autres composantes, (**Figure 1.10**) et sont impliquées dans la génération des 2 variétés de chicorée. Ils constituent donc de bons matériels à éditer et à analyser pour les sélectionneurs.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La chicorée est une plante dont les premières utilisations remontent à l’Égypte Antique. On la retrouve utilisée autant dans l’alimentation que dans les pharmacopées de nombreuses civilisations où elle a pu servir pour le traitement empirique de plaies, de problèmes digestifs ou encore du diabète. Les études pharmacologiques réalisées ont permis de confirmer certaines activités biologiques de la plante grâce à la présence de composés actifs tels que les composés phénoliques, les composés terpéniques ou encore l’inuline. La chicorée industrielle (*Cichorium intybus* var. *sativum*) est une plante emblématique de la région Hauts-de-France dont la racine est principalement cultivée pour la production de substitut de café mais de nouveaux marchés s’intéressent à cette plante pour une utilisation en tant qu’ingrédient fonctionnel. Quelques études ont d’ailleurs permis de montrer le développement de produits dérivés alimentaires contenant de la chicorée comme des biscuits, des gâteaux, du pain ou encore des yaourts dans lesquels une amélioration du produit et de sa valeur nutritionnelle pouvaient être observée [Bossard *et al.*, 2005 ; Massoud *et al.*, 2009 ; Ferreira *et al.*, 2016 ; Jeong *et al.*, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017 ; Abo Taled *et al.*, 2017 ; Volvoka *et al.*, 2019 ; Zeny *et al.*, 2019 ; Ivanišová *et al.*, 2020 ; Bokic *et al.*, 2022 ; Twarogowska *et al.*, 2022]. Toutefois, cette plante possède une amertume pouvant provoquer un rejet pour de nombreuses personnes et une dépréciation des produits. Afin de pouvoir développer de nouveaux produits utilisant la chicorée en tant qu’ingrédient fonctionnel, il est nécessaire d’en diminuer l’amertume. Cette saveur est principalement due à la présence de lactones sesquiterpéniques (STLs), des métabolites spécialisés produits dans la chicorée, et dont les principaux mentionnés sont la lactucine, la lactucopicrine, la 8-déoxylactucine et leurs dérivés dihydro-. L’implication de ces composés dans l’amertume a été démontrée dès 1990 par l’équipe de Price *et al.* qui a estimé la molécule la plus amère comme étant un glycoside de la lactucine. Cela a été remis en question la même année par l’équipe de Van Beek *et al.* qui a défini que la dihydro-lactucoprine et la lactucopicrine étaient les molécules contributrices à l’amertume. La voie de biosynthèse de ces molécules est partiellement élucidée mais elles dérivent toutes du farnésyl pyrophosphate par une série de cyclisations et de réarrangements réalisés par la germacrène A synthase (GAS), appartenant à la famille des sesquiterpènes synthases, la germacrène A oxydase (GAO), la costunolide synthase (COS) et la kauiniolide synthase (KLS), appartenant à la famille des cytochromes P450 [de Kraker *et al.*, 1998 ; de Kraker *et al.*, 2000 ; de Kraker *et al.*, 2001 ; Cankar *et al.*, 2022].

L’obtention de chicorées moins amères et donc ne produisant peu ou plus de STLs pourrait être abordée par des approches de sélection variétale classique. Toutefois, ces techniques de sélection sont longues et fastidieuses, surtout chez la chicorée qui est une espèce pour laquelle la création variétale passe par l’inter-croisement de plusieurs composantes. L’idée d’inhiber la voie de synthèse des enzymes clés et ainsi de réduire la production des STLs par mutagénèse ciblée paraissait être une

méthode permettant un gain de temps considérable. Ce postulat a été à l'origine des travaux de ma thèse dont les objectifs étaient d'améliorer la compréhension de la voie de biosynthèse conduisant à la production des STLs, de réaliser une preuve de concept que l'inhibition des gènes de la voie de biosynthèse des STLs conduisait à une diminution de la production de ces molécules et d'appliquer l'édition par CRISPR/Cas9 sur du matériel adapté à la sélection et permettre la production de chicorées dont l'amertume a été modulée.

Mes travaux ont démarré par l'analyse du génome de la chicorée afin de caractériser les principaux gènes décrits dans la littérature comme impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs. Cette analyse a permis la caractérisation de 10 gènes impliqués dans la biosynthèse des STLs et a confirmé la présence d'un seul gène *GAO* [Nguyen *et al.*, 2010], d'un seul gène correspondant à la forme longue du gène *GAS* (*GAS-L*) [Bouwmeester *et al.*, 2002 ; Bogdanovic *et al.*, 2019a] mais aussi de plusieurs copies existantes pour la forme courte du gène *GAS* (*GAS-S*). Seules quatre copies du gène *GAS-S* avaient été identifiées jusqu'à maintenant, et notre analyse a permis de mettre en évidence une cinquième copie nommée *GAS-S5*. De plus, plusieurs copies du gène *COS* ont été caractérisées via notre analyse, ce qui n'avait jamais été mentionné précédemment. Le report de ces gènes sur le génome de la chicorée ChicBitter002 a permis l'obtention des séquences et la définition des cibles qui ont servi pour l'édition par CRISPR/Cas9.

D'un point de vue expérimental, la chicorée est une plante « docile » ayant la capacité d'être cultivée *in vitro*, et de régénérer des plantes entières à partir de divers tissus, cultures cellulaires, protoplastes et chevelus racinaires [Crépy *et al.*, 1982 ; Sun *et al.*, 1991]. C'est le cas notamment de la chicorée ChicBitter002 qui est un clone, capable d'autofécondation et que l'on peut facilement multiplier *in vitro*. Pour ces raisons, l'établissement de la preuve de concept que l'inhibition des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des STLs provoque une diminution de l'amertume, a été réalisé sur ce génotype. En utilisant la méthode d'édition par CRISPR/Cas9 utilisant la transformation médiée par *R. rhizogenes* mise en place et maîtrisée au sein du laboratoire [Bernard *et al.*, 2019], les gènes *GAS-S* et *GAO* de la chicorée ChicBitter002 ont été édités. Cette édition a permis l'obtention de plusieurs événements de mutation, avec une efficacité de mutation globale de 26%. L'analyse du contenu en STLs des plantes régénérées à partir des lignées de chevelus racinaires mutées a pu être réalisée soit à partir du latex des feuilles soit à partir des racines. L'analyse du latex des feuilles présente l'intérêt de pouvoir s'effectuer dans les 2 mois après la sortie en serre des plantes régénérées (contre 3 mois minimum pour l'analyse de la racine) et ne nécessite pas le sacrifice de la plante, permettant de la conserver dans l'optique de réaliser de nouvelles analyses. Cependant, cette technique est difficile à standardiser et ne permet pas d'obtenir des molécules extraites stables. C'est

donc grâce à l'analyse du contenu en STLs des racines de chicorées éditées et régénérées à partir de chevelus racinaires que les données préliminaires obtenues avec le latex ont été confirmées. Les résultats ont mis en évidence une réduction de la production de STLs chez 2 lignées de chevelus racinaires : la lignée HR12, mutante bi-allélique pour les copies *GAS-S1* et *GAS-S2*, et la lignée HR18, mutante bi-allélique pour le gène *GAO*. La lignée HR12 a montré une réduction d'environ 90% de son contenu total en STLs, tandis que la lignée HR18, mutante bi-allélique pour le gène *GAO*, n'a montré qu'une diminution de 60,2% son contenu en STLs. Cette réduction, moins importante suggère que d'autres gènes seraient capables de prendre le relai lors de l'inhibition du gène *GAO*. Ces résultats montrent que les mutations bi-alléliques sont nécessaires pour impacter la production de STLs et que les copies *GAS-S1* et *GAS-S2* semblent jouer un rôle primordial dans la conversion du germacrène A en germacrène A oxydase. Cependant, le nombre de plantes issues de chevelus racinaires présentant des profils de mutations bi-alléliques étant faible, ces résultats n'ont pas pu être confirmés sur d'autres lignées mutantes. En effet, la transformation par *R. rhizogenes* implique l'intégration d'ADN-T modifiant le phénotype des plantes régénérées, cela a rendu problématique l'analyse du contenu en STLs des plantes régénérées. Tout d'abord parce que la difficulté des racines à tubériser n'a pas permis l'obtention de beaucoup de matériel pour le dosage des composés, et ensuite parce que de nombreuses plantes sont rapidement montées en fleurs, ce qui a provoqué une variation du contenu métabolique de la racine de chicorée. Malgré le faible nombre de plantes étudiées, cette étude a permis de mettre en place des éléments de compréhension et d'estimer que les copies *GAS-S1* et *GAS-S2* sont des bons candidats pour la détection de variants naturels moins riches en STLs. La création de mutants édité grâce à la transfection de protoplastes médiée par PEG devrait permettre d'éviter les problèmes de modification de phénotype et compléter ces analyses par l'obtention de nombreux vitroplants facilement multipliables *in vitro*.

L'objectif de créer des variétés moins amères, nous a aussi amené à réaliser des analyses sensorielles. La littérature n'est pas suffisamment claire sur l'implication des différentes STLs dans l'amertume. En effet, l'équipe de Price *et al.* [1990] considère qu'un glycoside de lactucine est la STL la plus amère tandis que l'équipe de Van Beek *et al.* [1990] affirme que ce sont la lactucopicrine et la dihydro-lactucopicrine. L'élaboration d'un système cellulaire exprimant les récepteurs à l'amertume TAS2R46 a permis de confirmer que la lactucopicrine et la dihydro-lactucopicrine étaient les molécules avec le seuil de perception le plus bas, et donc les plus amères [Yanagisawa et Misaka, 2021]. Toutefois, les différentes études de caractérisation des STLs de la chicorée ont montré que le contenu en STLs pouvait fortement influencer la perception de l'amertume et qu'il variait en fonction de la variété, du cultivar, des conditions de culture et de stockage et aussi des conditions climatiques [Ferioli *et al.*, 2015 ; Graziani *et al.*, 2015 ; Kips, 2017 ; Twarogowska *et al.*, 2020]. L'analyse sensorielle qui a été

entreprise au laboratoire a permis d'établir une corrélation entre la quantité de STLs dans les racines de chicorée et l'amertume, mais n'a pas montré de corrélation directe entre l'amertume et une molécule particulière. Les analyses suivantes ont donc été réalisées en prenant en compte la totalité des STLs comme marqueur de l'amertume. Grâce à l'analyse sensorielle, des scores d'amertume théoriques ont été attribués à chacune des lignées de chevelu racinaire mutantes. Cela a permis de confirmer que la mutation simultanée des copies *GAS-S1* et *GAS-S2* sur leurs deux allèles ou la mutation bi-allélique du gène *GAO* provoque une diminution de l'amertume.

En plus de leur rôle dans l'amertume, les STLs sont aussi connues pour jouer un rôle de défense contre les phytopathogènes. Ces effets ont été démontrés pour divers STLs tels que la lettucénine A, la déhydrocostuslactone, la 5 α -hydroxydéhydrocostuslactone, la déhydrozaluzanine C, la zaluzanine C, la costunolide et le parthénolide [Bennet *et al.*, 1994 ; Wedge *et al.*, 2000]. La chicorée est connue pour ses activités antibactériennes, antifongiques mais aussi antiparasitaires. Si l'effet antiparasitaire a été associé à la présence de STLs dans la chicorée [Peña-Espinoza *et al.*, 2015], cela n'a pas encore été démontré contre les bactéries et les champignons pathogènes des plantes. Le fait de diminuer la quantité de STLs dans les plantes de chicorée, voire de la réduire complètement, pourrait avoir un impact négatif sur les capacités de défense de la plante vis à vis des pathogènes. Des études seront nécessaires pour déterminer si les nouvelles variétés moins amères ne présentent pas de problèmes de sensibilité aux pathogènes. La chicorée est aussi une plante riche en composés phénoliques, acides phénoliques et acides hydroxycinnamiques, connues pour leurs activités antimicrobiennes chez l'Homme [Verma *et al.*, 2013 ; Khalaf *et al.*, 2018 ; Bernard *et al.*, 2022]. On peut donc se demander si ces composés phénoliques pourraient contrebalancer le déficit en STLs. Les mutants obtenus dans les travaux de cette thèse constituent donc un très bon matériel de recherche pour étudier leurs rôles dans les plantes.

Mon travail de thèse (bourse CIFRE) s'est déroulé au sein de l'Equipe Mixte Chic41H (Chicory for One Health) en collaboration avec l'entreprise Florimond-Desprez. Il est intégré dans un projet plus global : le projet « Amertume ». Lorsque ce projet a débuté en 2019, la Commission Européenne ne s'était pas encore prononcée sur la législation concernant CRISPR/Cas. Ce n'est que quelques mois après le début du projet que le système d'édition par CRISPR/Cas a été considéré comme une technologie générant des OGMs, et que la législation européenne interdisait son utilisation en Europe. Au cours de cette thèse, j'ai aussi dû faire face à la concurrence belge et hollandaise dont les travaux étaient plus avancés. Ces deux équipes ont déjà publié un ensemble de résultats mais leurs objectifs diffèrent un peu. D'un côté, la concurrence hollandaise [Bogdanovic *et al.*, 2019b ; Cankar *et al.*, 2021 ; Cankar *et al.*, 2022] cherche à éliminer les STLs en vue de faciliter l'extraction de l'inuline. D'un autre

côté, la concurrence belge souhaite diminuer l'amertume de la chicorée et de ses co-produits mais ils s'intéressent à l'endive, la chicorée witloof (*C. intybus* var. *foliosum*), qui est consommée pour ces feuilles [De Bruyn *et al.*, 2020]. Néanmoins, notre projet présente des particularités par rapport à ceux de nos concurrents puisque le choix a été fait de travailler sur deux aspects en parallèle : la génération de mutants par CRISPR/Cas9 et la variabilité génétique naturelle. Etant donnée la législation actuelle, c'est surtout grâce à la variabilité génétique naturelle que de nouvelles variétés moins amères pourront être produites, mais les connaissances obtenues par l'analyse des mutants obtenus par édition de gènes pourront contribuer à cette recherche. Le projet « Amertume » a aussi permis l'installation d'un pilote farine, au sein de l'entreprise Florimond-Desprez, ce qui permet la confection de farines de chicorée pour le développement de nouveaux projets. Actuellement des essais de panification sur des farines moins amères sont en cours avec des entreprises de boulangerie industrielle et une nouvelle variété moins amère est en cours de création.

Dans l'ensemble, les travaux de cette thèse ont conduit à la génération de nombreux mutants CRISPR/Cas9 selon 2 méthodes de transformation distinctes. Ces mutants constituent un matériel de choix pour déterminer les gènes les plus impliqués dans la biosynthèse des STLs et pour comprendre le rôle de ces composés dans la plante. Cependant, ces plantes sont actuellement considérées comme des OGMs ce qui empêche leur culture en Europe. L'entreprise Florimond-Desprez étant une entreprise internationale, elle aura peut-être la possibilité de mener des essais en champs, hors Europe, pour évaluer l'impact d'une diminution de la production de STLs sur le fitness de la plante et d'utiliser les mutants à des fins plus appliquées.

REFERENCES

- Aberham, A., Cicek, S. S., Schneider, P., and Stuppner, H. (2010). Analysis of sesquiterpene lactones, lignans, and flavonoids in wormwood (*Artemisia absinthium* L.) using high-performance liquid chromatography (HPLC)–mass spectrometry, reversed phase HPLC, and HPLC–solid phase extraction–nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10817–10823. doi: [10.1021/jf1022059](https://doi.org/10.1021/jf1022059).
- Abo Taled, H. M., Abd El Aziz, H. A., and Abd EL-Hameed, A. K. (2017). Utilization of chicory plant for supplementing some products. *Curr. Sci. Int* 6, 777–787.
- Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. P., and Zuker, C. S. (2000). A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100, 693–702. doi: [10.1016/S0092-8674\(00\)80705-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80705-9).
- Afendi, F. M., Okada, T., Yamazaki, M., Hirai-Morita, A., Nakamura, Y., Nakamura, K., et al. (2012). KNApSack family databases: integrated metabolite–plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol.* 53, e1(1-12). doi: [10.1093/pcp/pcr165](https://doi.org/10.1093/pcp/pcr165).
- Aharoni, A., Giri, A. P., Deuerlein, S., Griepink, F., de Kogel, W.-J., Verstappen, F. W. A., et al. (2003). Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell* 15, 2866–2884. doi: [10.1105/tpc.016253](https://doi.org/10.1105/tpc.016253).
- Aharoni, A., Jongsma, M., and Bouwmeester, H. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci.* 10, 594–602. doi: [10.1016/j.tplants.2005.10.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.005).
- Ahmad, M., Qureshi, R., Arshad, M., Khan, M. A., and Zafar, M. (2009). Traditional herbal remedies used for the treatment of diabetes from district Attock, Pakistan. *Pak. J. Bot.* 41, 2777–2782.
- Ahmed, B., Al-Howiriny, T. A., and Siddiqui, A. B. (2003). Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. *J. Ethnopharmacol.* 87, 237–240. doi: [10.1016/S0378-8741\(03\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00145-4).
- Ahmed, B., Khan, S., Masood, M. H., and Siddique, A. H. (2008). Anti-hepatotoxic activity of cichotyboside, a sesquiterpene glycoside from the seeds of *Cichorium intybus*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 10, 218–223. doi: [10.1080/10286020701590764](https://doi.org/10.1080/10286020701590764).
- Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M. Z., Amjad, M. S., Sadaf, H. M., Riaz, I., et al. (2017). Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6, 205–214.
- Ajasson de Grandsagne, J.-B. (1832). *Histoire Naturelle de Pline : Traduction Nouvelle*. Paris: Imprimerie de C.L.F. Panckoucke.
- Akber Aisa, H. A., Xin, X., and Tang, D. (2020). Chemical constituents and their pharmacological activities of plants from *Cichorium* genus. *Chin. Herb. Med.* 12, 224–236. doi: [10.1016/j.chmed.2020.05.001](https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.05.001).
- Aldin, E., Reitmeier, H. A., and Murphy, P. (2006). Bitterness of soy extracts containing isoflavones and saponins. *J. Food Sci.* 71, S211–S215. doi: [10.1111/j.1365-2621.2006.tb15643.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb15643.x).

- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A.-S., Samuelsson, M., and Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* 36, 117–128. doi: [10.1007/s00299-016-2062-3](https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3).
- Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Fält, A.-S., Ohlsson, P., Gonzalez, M. N., et al. (2018). Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol. Plant.* 164, 378–384. doi: [10.1111/ppl.12731](https://doi.org/10.1111/ppl.12731).
- Argout, X., Salse, J., Aury, J.-M., Guiltinan, M. J., Droc, G., Gouzy, J., et al. (2011). The genome of *Theobroma cacao*. *Nat. Genet.* 43, 101–108. doi: [10.1038/ng.736](https://doi.org/10.1038/ng.736).
- Arshid Shabir, P. (2021). “Chapter 9 - CRISPR/Cas9-mediated genome editing in medicinal and aromatic plants: developments and applications,” in *Medicinal and Aromatic Plants*, eds. T. Aftab and K. R. Hakeem (Academic Press), 209–221. doi: [10.1016/B978-0-12-819590-1.00009-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819590-1.00009-4).
- Augustine, R., and Bisht, N. C. (2019). Targeted silencing of genes in polyploids: lessons learned from *Brassica juncea*-glucosinolate system. *Plant Cell Rep.* 38, 51–57. doi: [10.1007/s00299-018-2348-8](https://doi.org/10.1007/s00299-018-2348-8).
- Azay-Milhau, J., Ferrare, K., Leroy, J., Aubaterre, J., Tournier, M., Lajoix, A.-D., et al. (2013). Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (*Cichorium intybus* L.): a comparative in vitro study with the effects of caffeic and ferulic acids. *J. Ethnopharmacol.* 150, 755–760. doi: [10.1016/j.jep.2013.09.046](https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.046).
- Bagheri, M., Bushehri, A. A. S., Hassandokht, M. R., and Naghavi, M. R. (2017). Evaluation of solasonine content and expression patterns of SGT1 gene in different tissues of two Iranian eggplant (*Solanum melongena* L.) genotypes. *Food Technol. Biotechnol.* 55, 236–242. doi: [10.17113/ftb.55.02.17.4883](https://doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4883).
- Bae, S., Park, J., and Kim, J.-S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473–1475. doi: [10.1093/bioinformatics/btu048](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu048).
- Bais, H. P., and Ravishankar, G. (2001). *Cichorium intybus* L - cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. *J. Sci. Food Agric.* 81, 467–484. doi: [10.1002/jsfa.817](https://doi.org/10.1002/jsfa.817).
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712. doi: [10.1126/science.1138140](https://doi.org/10.1126/science.1138140).
- Bartoszewski, G., Niedziela, A., Szwacka, M., and Niemirowicz-Szczytt, K. (2003). Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breed.* 122, 347–351. doi: [10.1046/j.1439-0523.2003.00864.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00864.x).
- Behrens, M., Brockhoff, A., Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., and Meyerhof, W. (2004). The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 479–485. doi: [10.1016/j.bbrc.2004.05.019](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.019).
- Behrens, M., Foerster, S., Staehler, F., Raguse, J.-D., and Meyerhof, W. (2007). Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogeneous population of bitter responsive taste receptor cells. *J. Neurosci.* 27, 12630–12640. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1168-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1168-07.2007).

- Bell, L., Methven, L., and Wagstaff, C. (2017). The influence of phytochemical composition and resulting sensory attributes on preference for salad rocket (*Eruca sativa*) accessions by consumers of varying TAS2R38 diplotype. *Food Chem.* 222, 6–17. doi: [10.1016/j.foodchem.2016.11.153](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.153).
- Bennett, M. H., Gallagher, M. D. S., Bestwick, C. S., Rossiter, J. T., and Mansfield, J. W. (1994). The phytoalexin response of lettuce to challenge by *Botrytis cinerea*, *Bremia lactucae* and *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44, 321–333. doi: [10.1016/S0885-5765\(05\)80046-3](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(05)80046-3).
- Bernard, G., Alves Dos Santos, H., Etienne, A., Samaille, J., Neut, C., Sahpaz, S., et al. (2020). MeJA elicitation of chicory hairy roots promotes efficient increase of 3,5-diCQA accumulation, a potent antioxidant and antibacterial molecule. *Antibiotics* 9, 659. doi: [10.3390/antibiotics9100659](https://doi.org/10.3390/antibiotics9100659).
- Bernard, G., Buges, J., Delporte, M., Molinié, R., Besseau, S., Bouchereau, A., et al. (2022). Consecutive action of two BAHD acyltransferases promotes tetracoumaroyl spermine accumulation in chicory. *Plant Physiol.* 189, 2029–2043. doi: [10.1093/plphys/kiac234](https://doi.org/10.1093/plphys/kiac234).
- Binding, H., Nehls, R., Kock, R., Finger, J., and Mordhorst, G. (1980). Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the dicotyledoneae class. *Z. Pflanzenphysiol.* 101, 119–130. doi: [10.1016/S0044-328X\(81\)80046-3](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(81)80046-3).
- Bischoff, T. A., Kelley, C. J., Karchesy, Y., Laurantos, M., Nguyen-Dinh, P., and Arefi, A. G. (2004). Antimalarial activity of Lactucin and Lactucopicrin: sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. *J. Ethnopharmacol.* 95, 455–457. doi: [10.1016/j.jep.2004.06.031](https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.031).
- Bogdanović, M., Cankar, K., Todorović, S., Dragičević, M., Simonović, A., van Houwelingen, A., et al. (2019a). Tissue specific expression and genomic organization of bitter sesquiterpene lactone biosynthesis in *Cichorium intybus* L. (Asteraceae). *Ind. Crop. Prod.* 129, 253–260. doi: [10.1016/j.indcrop.2018.12.011](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.011).
- Bogdanović, M., Cankar, K., Dragičević, M., Bouwmeester, H., Beekwilder, J., Simonović, A., et al. (2019b). Silencing of germacrene A synthase genes reduces guaianolide oxalate content in *Cichorium intybus* L. *GM. Crops. Food* 11, 1–13. doi: [10.1080/21645698.2019.1681868](https://doi.org/10.1080/21645698.2019.1681868).
- Bokić, J., Kojić, J., Krulj, J., Pezo, L., Banjac, V., Škrobot, D., et al. (2022). Development of a novel rice-based snack enriched with chicory root: physicochemical and sensory properties. *Foods* 11, 2393. doi: [10.3390/foods11162393](https://doi.org/10.3390/foods11162393).
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170).
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551–2561. doi: [10.1099/mic.0.28048-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0).
- Bonfiglio, G. V., Wierna, R. V., Bonini, N. A., Armada, M., and Goldner, M. C. (2020). Study of bitterness perception of quinoa (*Chenopodium quinoa* wild.) saponin extracts. *J. Cereal Sci.* 95, 103032. doi: [10.1016/j.jcs.2020.103032](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.103032).
- Bonvehi, J. S., and Coll, F. V. (1997). Evaluation of bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chem.* 60, 365–370. doi: [10.1016/S0308-8146\(96\)00353-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00353-6).

- Bossard, S., Leveque, M., and Marboutin, F. (2005). Use of a chicory flour for preparation of a food dough. European Union, EP 027.475.28A, 30 nov. 2005.
- Bouchez, D., and Camilleri, C. (1990). Identification of a putative *roIB* gene on the TR-DNA of the *Agrobacterium rhizogenes* A4 Ri plasmid. *Plant Mol. Biol.* 14, 617–619. doi: [10.1007/BF00027507](https://doi.org/10.1007/BF00027507).
- Bouwmeester, H. J., Kodde, J., Verstappen, F. W. A., Altug, I. G., de Kraker, J.-W., and Wallaart, T. E. (2002). Isolation and characterization of two germacrene A synthase cDNA clones from chicory. *Plant Physiol.* 129, 134–144. doi: [10.1104/pp.001024](https://doi.org/10.1104/pp.001024).
- Breslin, P. A. S. (1996). Interactions among salty, sour and bitter compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 390–399. doi: [10.1016/S0924-2244\(96\)10039-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(96)10039-X).
- Brockhoff, A., Behrens, M., Massarotti, A., Appendino, G., and Meyerhof, W. (2007). Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6236–6243. doi: [10.1021/jf070503p](https://doi.org/10.1021/jf070503p).
- Cadalen, T., Mörchen, M., Blassiau, C., Clabaut, A., Scheer, I., Hilbert, J.-L., et al. (2010). Development of SSR markers and construction of a consensus genetic map for chicory (*Cichorium intybus* L.). *Mol. Breed.* 25, 699–722. doi: [10.1007/s11032-009-9369-5](https://doi.org/10.1007/s11032-009-9369-5).
- Câmara, J. S., Albuquerque, B. R., Aguiar, J., Corrêa, R. C. G., Gonçalves, J. L., Granato, D., et al. (2021). Food bioactive compounds and emerging techniques for their extraction: polyphenols as a case study. *Foods* 10, 37. doi: [10.3390/foods10010037](https://doi.org/10.3390/foods10010037).
- Cankar, K., Houwelingen, A. van, Bosch, D., Sonke, T., Bouwmeester, H., and Beekwilder, J. (2011). A chicory cytochrome P450 mono-oxygenase CYP71AV8 for the oxidation of (+)-valencene. *FEBS Lett.* 585, 178–182. doi: [10.1016/j.febslet.2010.11.040](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.040).
- Cankar, K., Bundock, P., Sevenier, R., Häkkinen, S. T., Hakkert, J. C., Beekwilder, J., et al. (2021). Inactivation of the germacrene A synthase genes by CRISPR/Cas9 eliminates the biosynthesis of sesquiterpene lactones in *Cichorium intybus* L. *Plant Biotechnol. J.* 19, 2442–2453. doi: [10.1111/pbi.13670](https://doi.org/10.1111/pbi.13670).
- Cankar, K., Hakkert, J. C., Sevenier, R., Campo, E., Schipper, B., Papastolopoulou, C., et al. (2022). CRISPR/Cas9 targeted inactivation of the kauniolide synthase in chicory results in accumulation of costunolide and its conjugates in taproots. *Front. Plant Sci.* 13, 940003. doi: [10.3389/fpls.2022.940003](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.940003).
- Carlson, D. G., Daxenbichler, M. E., VanEtten, C. H., Hill, C. B., and Williams, P. H. (1985). Glucosinolates in radish cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110, 634–638. doi: [10.21273/JASHS.110.5.634](https://doi.org/10.21273/JASHS.110.5.634).
- Cavin, C., Delannoy, M., Malnoe, A., Debefve, E., Touché, A., Courtois, D., et al. (2005). Inhibition of the expression and activity of cyclooxygenase-2 by chicory extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 742–749. doi: [10.1016/j.bbrc.2004.12.061](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.061).
- Chadwick, M., Gawthrop, F., Michelmore, R. W., Wagstaff, C., and Methven, L. (2016). Perception of bitterness, sweetness and liking of different genotypes of lettuce. *Food Chem.* 197, 66–74. doi: [10.1016/j.foodchem.2015.10.105](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.105).

- Chandran, R. P., and Potty, V. P. (2008). Induction of hairy roots through the mediation of four strains of *Agrobacterium rhizogenes* on five host plants. *Indian J. Biotechnol.* 7, 122–128.
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., et al. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100, 703–711. doi: [10.1016/S0092-8674\(00\)80706-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80706-0).
- Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A., Hummler, E., Ryba, N. J. P., et al. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464, 297–301. doi: [10.1038/nature08783](https://doi.org/10.1038/nature08783).
- Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J., and Pichersky, E. (2011). The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* 66, 212–229. doi: [10.1111/j.1365-3113X.2011.04520.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2011.04520.x).
- Chen, L., Liu, F., Yang, Y., Tu, Z., Lin, J., Ye, Y., et al. (2021). Oxygen-enriched fermentation improves the taste of black tea by reducing the bitter and astringent metabolites. *Food Res. Int.* 148, 110613. doi: [10.1016/j.foodres.2021.110613](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110613).
- Chen, Y.-H., Zhang, Y.-H., Chen, G.-S., Yin, J.-F., Chen, J.-X., Wang, F., et al. (2022). Effects of phenolic acids and quercetin-3-O-rutinoside on the bitterness and astringency of green tea infusion. *npj Sci. Food* 6, 8. doi: [10.1038/s41538-022-00124-8](https://doi.org/10.1038/s41538-022-00124-8).
- Cheng, C.-Y., Krishnakumar, V., Chan, A. P., Thibaud-Nissen, F., Schobel, S., and Town, C. D. (2017). Araport11: a complete reannotation of the *Arabidopsis thaliana* reference genome. *Plant J.* 89, 789–804. doi: [10.1111/tpj.13415](https://doi.org/10.1111/tpj.13415).
- Choi, S.-H., Ryu, D.-K., Park, S., Ahn, K.-G., Lim, Y.-P., and An, G. (2010). Composition analysis between kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) and radish (*Raphanus sativus*). *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28, 469–475.
- Clifford, M. N. (1985). “Chlorogenic acids,” in *Coffee* (Dordrecht, Netherlands: Springer), 153–202.
- Clifford, M. N., Shutler, S., Thomas, G. A., and Ohiokpehai, O. (1987). The chlorogenic acids content of coffee substitutes. *Food Chem.* 24, 99–107. doi: [10.1016/0308-8146\(87\)90042-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(87)90042-2).
- Cravotto, G., Nano, G. M., Binello, A., Spagliardi, P., and Seu, G. (2005). Chemical and biological modification of cynaropicrin and grosheimin: a structure–bitterness relationship study. *J. Sci. Food Agric.* 85, 1757–1764. doi: [10.1002/jsfa.2180](https://doi.org/10.1002/jsfa.2180).
- Crepy, L., Chupeau, M.-C., and Chupeau, Y. (1982). The isolation and culture of leaf protoplasts of *Cichorium intybus* and their regeneration into plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 107, 123–131. doi: [10.1016/S0044-328X\(82\)80098-6](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(82)80098-6).
- D’Amelia, V., Docimo, T., Crocoll, C., and Rigano, M. M. (2021). Specialized metabolites and valuable molecules in crop and medicinal plants: the evolution of their use and strategies for their production. *Genes* 12, 936. doi: [10.3390/genes12060936](https://doi.org/10.3390/genes12060936).
- Dagan-Wiener, A., Nissim, I., Ben Abu, N., Borgonovo, G., Bassoli, A., and Niv, M. Y. (2017). Bitter or not? BitterPredict, a tool for predicting taste from chemical structure. *Sci. Rep.* 7, 12074. doi: [10.1038/s41598-017-12359-7](https://doi.org/10.1038/s41598-017-12359-7).

- Dagan-Wiener, A., Di Pizio, A., Nissim, I., Bahia, M. S., Dubovski, N., Margulis, E., et al. (2019). BitterDB: taste ligands and receptors database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, D1179–D1185. doi: [10.1093/nar/gky974](https://doi.org/10.1093/nar/gky974).
- Dalar, A., and Konczak, I. (2014). *Cichorium intybus* from Eastern Anatolia: Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Ind. Crops Prod.* 60, 79–85. doi: [10.1016/j.indcrop.2014.05.043](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.043).
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., and Lowe, K. C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnol. Adv.* 23, 131–171. doi: [10.1016/j.biotechadv.2004.09.008](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008).
- Davey, M. R., Anthony, P., Patel, D., and Power, B. (2010). “Plant protoplasts : Isolation, culture and plant regeneration,” in *Plant cell culture : Essential methods*, eds. M. R. Davey and P. Anthony (John Wiley & Sons, Ltd), 39–59.
- Davidovich-Rikanati, R., Shalev, L., Baranes, N., Meir, A., Itkin, M., Cohen, S., et al. (2015). Recombinant yeast as a functional tool for understanding bitterness and cucurbitacin biosynthesis in watermelon (*Citrullus* spp.). *Yeast* 32, 103–114. doi: [10.1002/yea.3049](https://doi.org/10.1002/yea.3049).
- Dawid, C., and Hofmann, T. (2014). Quantitation and bitter taste contribution of saponins in fresh and cooked white asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Food Chem.* 145, 427–436. doi: [10.1016/j.foodchem.2013.08.057](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.057).
- De Bruyn, C., Ruttink, T., Eeckhaut, T., Jacobs, T., De Keyser, E., Goossens, A., et al. (2020). Establishment of CRISPR/Cas9 genome editing in witloof (*Cichorium intybus* var. *foliosum*). *Front. Genome Ed.* 2, 604876. doi: [10.3389/fgeed.2020.604876](https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.604876).
- de Kraker, J.-W., Franssen, M. C. R., de Groot, A., König, W. A., and Bouwmeester, H. J. (1998). (+)-Germacrene A biosynthesis: the committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. *Plant Physiol.* 117, 1381–1392. doi: [10.1104/pp.117.4.1381](https://doi.org/10.1104/pp.117.4.1381).
- de Kraker, J.-W., Franssen, M. C. R., Dalm, M. C. F., de Groot, A., and Bouwmeester, H. J. (2001). Biosynthesis of germacrene A carboxylic acid in chicory roots. Demonstration of a cytochrome P450 (+)-germacrene A hydroxylase and NADP⁺-dependent sesquiterpenoid dehydrogenase(s) involved in sesquiterpene lactone biosynthesis. *Plant Physiol.* 125, 1930–1940. doi: [10.1104/pp.125.4.1930](https://doi.org/10.1104/pp.125.4.1930).
- de Kraker, J.-W., Franssen, M. C. R., Joerink, M., Groot, A. de, and Bouwmeester, H. J. (2002). Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. *Plant Physiol.* 129, 257–268. doi: [10.1104/pp.010957](https://doi.org/10.1104/pp.010957).
- Demeulemeester, M. A. C., and De Proft, M. P. (1999). In vivo and in vitro flowering response of chicory (*Cichorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant Cell Rep.* 18, 781–785. doi: [10.1007/s002990050661](https://doi.org/10.1007/s002990050661).
- Denev, P., Petkova, N., Ivanov, I., Sirakov, B., Vrancheva, R., and Pavlov, A. (2014). Determination of biologically active substances in taproot of common chicory (*Cichorium intybus* L.). *Sci. Bull. Ser. F Biotech.* 18, 124–129.

- Deryckere, D., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J., and Van Bockstaele, E. (2012). Low melting point agarose beads as a standard method for plantlet regeneration from protoplasts within the *Cichorium* genus. *Plant Cell Rep.* 31, 2261–2269. doi: [10.1007/s00299-012-1335-8](https://doi.org/10.1007/s00299-012-1335-8).
- Di Pizio, A., and Niv, M. Y. (2015). Promiscuity and selectivity of bitter molecules and their receptors. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 4082–4091. doi: [10.1016/j.bmc.2015.04.025](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.025).
- Dicenta, F., and García, J. E. (1993). Inheritance of the kernel flavour in almond. *Heredity* 70, 308–312. doi: [10.1038/hdy.1993.44](https://doi.org/10.1038/hdy.1993.44).
- Dielen, V., Notté, C., Lutts, S., Debavelaere, V., Van Herck, J.-C., and Kinet, J.-M. (2005). Bolting control by low temperatures in root chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*). *Field Crops Res.* 94, 76–85. doi: [10.1016/j.fcr.2004.11.005](https://doi.org/10.1016/j.fcr.2004.11.005).
- Dixon, R. A., and Strack, D. (2003). Phytochemistry meets genome analysis, and beyond..... *Phytochemistry* 62, 815–816. doi: [10.1016/S0031-9422\(02\)00712-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00712-4).
- Dolejs, L., Herout, V., and Sorm, F. (1958). On terpenes. XCIV. The structure of lactucin. *Collect. Czech. Chem. Commun* 23, 2195–2200.
- Durairaj, J., Di Girolamo, A., Bouwmeester, H. J., de Ridder, D., Beekwilder, J., and van Dijk, A. DJ. (2019). An analysis of characterized plant sesquiterpene synthases. *Phytochemistry* 158, 157–165. doi: [10.1016/j.phytochem.2018.10.020](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.10.020).
- Edelman, J., and Jefford, T. G. (1968). The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytol.* 67, 517–531. doi: [10.1111/j.1469-8137.1968.tb05480.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1968.tb05480.x).
- El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., and Lyoussi, B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J. Ethnopharmacol.* 86, 149–158. doi: [10.1016/S0378-8741\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00012-6).
- Eljounaidi, K., Cankar, K., Comino, C., Moglia, A., Hehn, A., Bourgaud, F., et al. (2014). Cytochrome P450s from *Cynara cardunculus* L. CYP71AV9 and CYP71BL5, catalyze distinct hydroxylations in the sesquiterpene lactone biosynthetic pathway. *Plant Sci.* 223, 59–68. doi: [10.1016/j.plantsci.2014.03.007](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.03.007).
- Engel, E., Baty, C., le Corre, D., Souchon, I., and Martin, N. (2002). Flavor-active compounds potentially implicated in cooked cauliflower acceptance. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6459–6467. doi: [10.1021/jf025579u](https://doi.org/10.1021/jf025579u).
- Fan, W., Wang, S., Wang, H., Wang, A., Jiang, F., Liu, H., et al. (2022). The genomes of chicory, endive, great burdock and yacon provide insights into Asteraceae palaeo-polyploidization history and plant inulin production. *Mol. Ecol. Resour.* 22, 3124–3140. doi: [10.1111/1755-0998.13675](https://doi.org/10.1111/1755-0998.13675).
- Fenwick, G. R., and Griffiths, N. M. (1981). The identification of the goitrogen, (-)-5-vinyloxazolidine-2-thione (goitrin), as a bitter principle of cooked brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*). *Z. Lebensm. Unters. Forch.* 172, 90–92. doi: [10.1007/BF01042410](https://doi.org/10.1007/BF01042410).

- Fenwick, G. R., Griffiths, N. M., and Heaney, R. K. (1983). Bitterness in brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera*): The role of glucosinolates and their breakdown products. *J. Sci. Food Agric.* 34, 73–80. doi: [10.1002/jsfa.2740340111](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740340111).
- Ferioli, F., Manco, M. A., and D'Antuono, L. F. (2015). Variation of sesquiterpene lactones and phenolics in chicory and endive germplasm. *J. Food Compos. Anal.* 39, 77–86. doi: [10.1016/j.jfca.2014.11.014](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.014).
- Ferreira, R. E., Park, K. J., Chang, Y. K., and Oliveira, R. A. (2016). Physical evaluation of cakes elaborated with chicory root flour used as source of inulin. *RBPA* 18, 155–159. doi: [10.15871/1517-8595/rbpa.v18n2p155-159](https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v18n2p155-159).
- Filippo D'Antuono, L., Ferioli, F., and Manco, M. A. (2016). The impact of sesquiterpene lactones and phenolics on sensory attributes: An investigation of a curly endive and escarole germplasm collection. *Food Chem.* 199, 238–245. doi: [10.1016/j.foodchem.2015.12.002](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.002).
- Fischer, U. A., Dettmann, J. S., Carle, R., and Kammerer, D. R. (2011). Impact of processing and storage on the phenolic profiles and contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) juices. *Eur. Food Res. Technol.* 233, 797. doi: [10.1007/s00217-011-1560-3](https://doi.org/10.1007/s00217-011-1560-3).
- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., and Roberfroid, M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 41, 353–362. doi: [10.1080/20014091091841](https://doi.org/10.1080/20014091091841).
- Foster, J. G., Cassida, K. A., and Turner, K. E. (2011). In vitro analysis of the anthelmintic activity of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) sesquiterpene lactones against a predominantly *Haemonchus contortus* egg population. *Vet. Parasitol.* 180, 298–306. doi: [10.1016/j.vetpar.2011.03.013](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.013).
- Francesca, N., Barbera, M., Martorana, A., Saiano, F., Gaglio, R., Aponte, M., et al. (2016). Optimised method for the analysis of phenolic compounds from caper (*Capparis spinosa* L.) berries and monitoring of their changes during fermentation. *Food Chem.* 196, 1172–1179. doi: [10.1016/j.foodchem.2015.10.045](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.045).
- Francisco, M., Velasco, P., Romero, Á., Vázquez, L., and Cartea, M. E. (2009). Sensory quality of turnip greens and turnip tops grown in northwestern Spain. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 281–290. doi: [10.1007/s00217-009-1163-4](https://doi.org/10.1007/s00217-009-1163-4).
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87, S287–S291. doi: [10.1079/BJN/2002550](https://doi.org/10.1079/BJN/2002550).
- Fritsche, J., Beindorff, C., Dachtler, M., Zhang, H., and Lammers, J. (2002). Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 149–157. doi: [10.1007/s00217-002-0507-0](https://doi.org/10.1007/s00217-002-0507-0).
- Fujita, H., and Kuroki, A. (2004). Pharmaceutical formulations comprising sodium laurylsulfate as bitterness masking agent. European Union, EP 030.041.91A, 1 sept. 2004.
- Fukao, M., Shirono, H., Takada, W., Moriuchi, T., and Fukaya, T. (2019). Debitting of red bell pepper (*Capsicum annuum*) juice retaining a high vitamin bB content, using a styrene-divinylbenzene adsorbent resin. *Food Sci. Technol. Res.* 25, 57–63. doi: [10.3136/fstr.25.57](https://doi.org/10.3136/fstr.25.57).

- Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F., and Robinson, H. (2009). "Classification of Compositae," in *Systematics, Evolution and Biogeography of the Compositae* (Vienna: Bayer (Eds)).
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151–158. doi: [10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5).
- Garcia, J., and Hankins, W. G. (1975). "The evolution of bitter and the acquisition of toxiphobia," in *Olfaction and Taste: 5th Symposium* (Elsevier), 39–45. doi: [10.1016/B978-0-12-209750-8.50014-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-209750-8.50014-7).
- Garneau, J. E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., et al. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 468, 67–71. doi: [10.1038/nature09523](https://doi.org/10.1038/nature09523).
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E2579–E2586. doi: [10.1073/pnas.1208507109](https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109).
- Gaudette, N. J., and Pickering, G. J. (2012). Optimizing the orosensory properties of model functional beverages: the influence of novel sweeteners, odorants, bitter blockers, and their mixtures on (+)-catechin. *J. Food Sci.* 77, S226–S232. doi: [10.1111/j.1750-3841.2012.02707.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02707.x).
- Gelvin, S. B. (2010). Plant proteins involved in *agrobacterium* -mediated genetic transformation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 45–68. doi: [10.1146/annurev-phyto-080508-081852](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081852).
- Gianquinto, G., and Pimpini, F. (1995). Morphological and physiological aspects of phase transition in radicchio (*Cichorium intybus* L. var. *silvestre* Bischoff): the influence of temperature. *Adv. Hortic. Sci.* 9, 192–199.
- Gianquinto, G. (1997). Morphological and physiological aspects of phase transition in radicchio (*Cichorium intybus* L. var. *silvestre* Bisch.): influence of daylength and its interaction with low temperature. *Sci. Hortic.* 71, 13–26. doi: [10.1016/S0304-4238\(97\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(97)00058-7).
- Gibson, Y., and Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412. doi: [10.1093/jn/125.6.1401](https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401).
- Giri, A., Ravindra, S. T., Dhingra, V., and Lakshmi Narasu, M. (2001). Influence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on induction of hairy roots and artemisinin production in *Artemisia annua*. *Curr. Sci.* 81, 378–382.
- Gómez-Caravaca, A. M., Iafelice, G., Verardo, V., Marconi, E., and Caboni, M. F. (2014). Influence of pearling process on phenolic and saponin content in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Food Chem.* 157, 174–178. doi: [10.1016/j.foodchem.2014.02.023](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.023).
- Gonthier, L., Bellec, A., Blassiau, C., Prat, E., Helmstetter, N., Rambaud, C., et al. (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. doi: [10.1186/1756-0500-3-225](https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-225).
- Graziani, G., Ferracane, R., Sambo, P., Santagata, S., Nicoletto, C., and Fogliano, V. (2015). Profiling chicory sesquiterpene lactones by high resolution mass spectrometry. *Food Res. Int.* 67, 193–198. doi: [10.1016/j.foodres.2014.11.021](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.021).

- Green, B. G., and Hayes, J. E. (2004). Individual differences in perception of bitterness from capsaicin, piperine and zingerone. *Chem. Senses* 29, 53–60. doi: [10.1093/chemse/bjh005](https://doi.org/10.1093/chemse/bjh005).
- Greene, T. A., Alarcon, S., Thomas, A., Berdough, E., Doranz, B. J., Breslin, P. A. S., et al. (2011). Probenecid inhibits the human bitter taste receptor TAS2R16 and suppresses bitter perception of salicin. *PLoS ONE* 6, e20123. doi: [10.1371/journal.pone.0020123](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020123).
- Grill, H. J., and Norgren, R. (1978). The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res.* 143, 263–279. doi: [10.1016/0006-8993\(78\)90568-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(78)90568-1).
- Guarrera, P. M., Forti, G., and Marignoli, S. (2005). Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J. Ethnopharmacol.* 96, 429–444. doi: [10.1016/j.jep.2004.09.014](https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.014).
- Gupta, D. B., and Gulrajani, M. L. (1993). Studies on dyeing with natural dye Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone). *Indian J. Fibre Text. Res.* 18, 202–206.
- Habtemariam, S. (2019). “Introduction to plant secondary metabolites—From biosynthesis to chemistry and antidiabetic action,” in *Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases* (Academic Press), 109–132. doi: [10.1016/B978-0-08-102922-0.00006-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102922-0.00006-7).
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.-B., et al. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 17, 148. doi: [10.1186/s13059-016-1012-2](https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2).
- Hall, R. D., Riksen-Bruinsma, T., Weyens, G. J., Rosquin, I. J., Denys, P. N., Evans, I. J., et al. (1996). A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nat. Biotechnol.* 14, 1133–1138. doi: [10.1038/nbt0996-1133](https://doi.org/10.1038/nbt0996-1133).
- Hanlidou, E., Karousou, R., Kleftoyanni, V., and Kokkini, S. (2004). The herbal market of Thessaloniki (N Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition. *J. Ethnopharmacol.* 91, 281–299. doi: [10.1016/j.jep.2004.01.007](https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.01.007).
- Hasegawa, S., Berhow, M. A., and Fong, C. H. (1996). “Analysis of bitter principles in citrus,” in *Fruit Analysis Modern Methods of Plant Analysis.*, eds. H. F. Linskens and J. F. Jackson (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 59–80. doi: [10.1007/978-3-642-79660-9_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79660-9_4).
- Heldt, H.-W. (2005). *Plant Biochemistry*. USA: Elsevier Academic Press.
- Heller, R. (1953). Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14, 1–223.
- Heng, L., Vincken, J.-P., van Koningsveld, G., Legger, A., Gruppen, H., van Boekel, T., et al. (2006). Bitterness of saponins and their content in dry peas. *J. Sci. Food Agric.* 86, 1225–1231. doi: [10.1002/jsfa.2473](https://doi.org/10.1002/jsfa.2473).
- Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., and Schell, J. (1983). Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303, 209–213. doi: [10.1038/303209a0](https://doi.org/10.1038/303209a0).

- Herrera-Estrella, L., Simpson, J., and Martínez-Trujillo, M. (2004). "Transgenic Plants: An Historical Perspective," in *Transgenic Plants* (New Jersey: Humana Press), 003–032. doi: [10.1385/1-59259-827-7:003](https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:003).
- Hincha, D. K., Hellwege, E. M., Heyer, A. G., and Crowe, J. H. (2000). Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. *Eur. J. Biochem.* 267, 535–540. doi: [10.1046/j.1432-1327.2000.01028.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01028.x).
- Hirst, E. L. (1959). The bakerian lecture. molecular structure in the polysaccharide group. *Proc. R. Soc. Lon. A Math. Phys. Sci.* 252, 287–312.
- Holzer, K., and Zinke, A. (1953). Über die bitterstoffe der zichorie (*Cichorium intybus* L.). *Monatsh. Chem.* 84, 901–909. doi: [10.1007/BF00899298](https://doi.org/10.1007/BF00899298).
- Horie, H., Ito, H., Ippoushi, K., Azuma, K., Sakata, Y., and Igarashi, I. (2007). Cucurbitacin C—bitter principle in cucumber plants. *JIRCAS* 41, 65–68. doi: [10.6090/jarq.41.65](https://doi.org/10.6090/jarq.41.65).
- Hou, L., Zhang, Y., Li, C., Wang, X., and Wang, S. C. (2021). Determination of main bitter compounds in soaked and germinated sesame pastes. *J. Oleo Sci.* 70, 31–38. doi: [10.5650/jos.ess20169](https://doi.org/10.5650/jos.ess20169).
- Hsu, C.-T., Lee, W.-C., Cheng, Y.-J., Yuan, Y.-H., Wu, F.-H., and Lin, C.-S. (2021). Genome editing and protoplast regeneration to study plant–pathogen interactions in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Front. Genome Ed.* 2, 627803. doi: [10.3389/fgeed.2020.627803](https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.627803).
- Hua, D., Fu, J., Liu, L., Yang, X., Zhang, Q., and Xie, M. (2019). Change in bitterness, accumulation of cucurbitacin B and expression patterns of CuB biosynthesis-related genes in melon during fruit development. *Hort. J.* 88, 253–262. doi: [10.2503/hortj.UTD-004](https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-004).
- Huber, M., Triebwasser-Freese, D., Reichelt, M., Heiling, S., Paetz, C., Chandran, J. N., et al. (2015). Identification, quantification, spatiotemporal distribution and genetic variation of major latex secondary metabolites in the common dandelion (*Taraxacum officinale* agg.). *Phytochemistry* 115, 89–98. doi: [10.1016/j.phytochem.2015.01.003](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.01.003).
- Huffman, G. A., White, F. F., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1984). Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. *J. Bacteriol.* 157, 269–276. doi: [10.1128/jb.157.1.269-276.1984](https://doi.org/10.1128/jb.157.1.269-276.1984).
- Hufnagel, J. C., and Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1376–1386. doi: [10.1021/jf073031n](https://doi.org/10.1021/jf073031n).
- Hutt, T. F., and Herrington, M. E. (1985). The determination of bitter principles in zucchinis. *J. Sci. Food Agric.* 36, 1107–1112. doi: [10.1002/jsfa.2740361112](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740361112).
- Intelmann, D., Batram, C., Kuhn, C., Haseleu, G., Meyerhof, W., and Hofmann, T. (2009). Three TAS2R bitter taste receptors mediate the psychophysical responses to bitter compounds of hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Chem. Percept.* 2, 118–132. doi: [10.1007/s12078-009-9049-1](https://doi.org/10.1007/s12078-009-9049-1).
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and

- identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433. doi: [10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987](https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987).
- Ivanišová, E., Drevková, B., Tokár, M., Terentjeva, M., Krajčovič, T., and Kačániová, M. (2020). Physicochemical and sensory evaluation of biscuits enriched with chicory fiber. *Food Sci. Technol. Int.* 26, 38–43. doi: [10.1177/1082013219864753](https://doi.org/10.1177/1082013219864753).
- Jansen, Ruud., Embden, Jan. D. A. van, Gaastra, Wim., and Schouls, Leo. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575. doi: [10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x).
- Jarić, S., Popović, Z., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., et al. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J. Ethnopharmacol.* 111, 160–175. doi: [10.1016/j.jep.2006.11.007](https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.007).
- Jeong, D., Kim, D.-H., Oh, Y.-T., Chon, J.-W., Kim, H., Jeong, D.-K., et al. (2017). Production of bioactive yoghurt containing *Cichorium intybus* L. (chicory) extract - preliminary study. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 35, 9–15. doi: [10.22424/jmsb.2017.35.1.009](https://doi.org/10.22424/jmsb.2017.35.1.009).
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., and Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2897–2908. doi: [10.1021/jf101303g](https://doi.org/10.1021/jf101303g).
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., and Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 41, e188–e188. doi: [10.1093/nar/gkt780](https://doi.org/10.1093/nar/gkt780).
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. doi: [10.1126/science.1225829](https://doi.org/10.1126/science.1225829).
- Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., and Eddouks, M. (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *J. Ethnopharmacol.* 77, 175–182. doi: [10.1016/S0378-8741\(01\)00289-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00289-6).
- Jouanin, L. (1984). Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. *Plasmid* 12, 91–102. doi: [10.1016/0147-619X\(84\)90055-6](https://doi.org/10.1016/0147-619X(84)90055-6).
- Judžentienė, A., and Būdienė, J. (2008). Volatile constituents from aerial parts and roots of *Cichorium intybus* L. (chicory) grown in Lithuania. *Chemija* 19, 25–28.
- Jurgoński, A., Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., and Król, B. (2012). Caffeoylquinic acid-rich extract from chicory seeds improves glycemia, atherogenic index, and antioxidant status in rats. *Nutrition* 28, 300–306. doi: [10.1016/j.nut.2011.06.010](https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.06.010).
- Juśkiewicz, J., Zduńczyk, Z., Żary-Sikorska, E., Król, B., Milala, J., and Jurgoński, A. (2011). Effect of the dietary polyphenolic fraction of chicory root, peel, seed and leaf extracts on caecal fermentation and blood parameters in rats fed diets containing prebiotic fructans. *Br. J. Nutr.* 105, 710–720. doi: [10.1017/S0007114510004344](https://doi.org/10.1017/S0007114510004344).

- Kandeler, R., and Ullrich, W. R. (2009). Symbolism of plants: examples from European-Mediterranean culture presented with biology and history of art. *J. Exp. Bot.* 60, 3973–3974. doi: [10.1093/jxb/erp248](https://doi.org/10.1093/jxb/erp248).
- Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinformatics* 20, 1160–1166. doi: [10.1093/bib/bbx108](https://doi.org/10.1093/bib/bbx108).
- Ke, J., Cheng, J., Luo, Q., Wu, H., Shen, G., and Zhang, Z. (2021). Identification of two bitter components in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. and exploration of their bitter taste mechanism through receptor hTAS2R14. *Food Chem.* 338, 127816. doi: [10.1016/j.foodchem.2020.127816](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127816).
- Khalaf, H. A., El-Saadani, R. M., El-Desouky, A. I., Abdeldaiem, M. H., and Elmehy, M. E. (2018). Antioxidant and antimicrobial activity of gamma-irradiated chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves and roots. *J. Food Meas. Charact.* 12, 1843–1851. doi: [10.1007/s11694-018-9798-0](https://doi.org/10.1007/s11694-018-9798-0).
- Kiers, A. M. (2000). Endive, Chicory, and their wild relatives: A systematic and phylogenetic study of *Cichorium* (Asteraceae). *Gotteria Suppl.* 5, 1–76.
- Kips, L. (2017). Characterization and processing of horticultural byproducts: a case-study of tomato and Belgian endive roots (Thèse).
- Kisiel, W., and Zielińska, K. (2001). Guaianolides from *Cichorium intybus* and structure revision of *Cichorium* sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 57, 523–527. doi: [10.1016/S0031-9422\(01\)00072-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00072-3).
- Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., and Vanek, T. (2002). Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 82, 51–53. doi: [10.1016/S0378-8741\(02\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00143-5).
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 37, 67–78. doi: [10.1016/j.mib.2017.05.008](https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008).
- Kops, J., and Gevers Deijnoot, P. M. E. (1853). *Flora Batava: of Afbeelding en Beschrijving van Nederlandsche Gewassen*, XI. Deel. Amsterdam: J. C. Sepp en Zoon.
- Krasteva-Christ, G., Weihong, L., and Tizzano, M. (2020). “3.18 - Extraoral Taste Receptors,” in *The Senses: A Comprehensive Reference (Second Edition)* (Elsevier), 353–381. doi: [10.1016/B978-0-12-809324-5.23827-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.23827-3).
- Kreutzmann, S., Christensen, L. P., and Edelenbos, M. (2008). Investigation of bitterness in carrots (*Daucus carota* L.) based on quantitative chemical and sensory analyses. *LWT* 41, 193–205. doi: [10.1016/j.lwt.2007.02.024](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.024).
- Kumar, D., Dai, R., Alam, T., and Sawant, P. (2017). Effect of dried chicory root extract on sensory and physical characteristics of yoghurt-ice cream with addition of buttermilk using response surface methodology. *Res. rev.: J. Food. Dairy Technol.* 5, 16–25.
- Kuusi, T., and Autio, K. (1985). The bitterness properties of dandelion. I. Sensory investigations. *Lebens. Wiss. Technol* 18, 339–346.
- Kuusi, T., Pysalo, H., and Autio, K. (1985). The bitterness properties of dandelion. II. Chemical investigations. *Lebens. Wiss. Technol* 18, 339–346.

- Laaksonen, O., Sandell, M., and Kallio, H. (2010). Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. *Eur. Food Res. Technol.* 231, 271–285. doi: [10.1007/s00217-010-1278-7](https://doi.org/10.1007/s00217-010-1278-7).
- Laaksonen, O., Sandell, M., Järvinen, R., and Kallio, H. (2011). Orosensory contributing compounds in crowberry (*Empetrum nigrum*) press-byproducts. *Food Chem.* 124, 1514–1524. doi: [10.1016/j.foodchem.2010.08.005](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.005).
- Lachenmeier, D. W. (2007). Assessing the authenticity of absinthe using sensory evaluation and HPTLC analysis of the bitter principle absinthin. *Food Res. Int.* 40, 167–175. doi: [10.1016/j.foodres.2006.09.002](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.09.002).
- Lafi, Z., Aboalhaja, N., and Afifi, F. (2022). Ethnopharmacological importance of local flora in the traditional medicine of Jordan: (A mini review). *Jordan J. Pharm. Sci.* 15, 132–144. doi: [10.35516/jjps.v15i1.300](https://doi.org/10.35516/jjps.v15i1.300).
- Lambert, C., and Tepfer, D. (1992). Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theor. Appl. Genet.* 85, 105–109. doi: [10.1007/BF00223851](https://doi.org/10.1007/BF00223851).
- Lander, E. S. (2016). The heroes of CRISPR. *Cell* 164, 18–28. doi: [10.1016/j.cell.2015.12.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041).
- Leclercq, E. (1984). Determination of lactucin in roots of chicory (*Cichorium intybus* L.) by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 283, 441–444. doi: [10.1016/S0021-9673\(00\)96288-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)96288-5).
- Leite Toneli, J. T. C., Mürr, F. E. X., Martinelli, P., Dal Fabbro, I. M., and Park, K. J. (2007). Optimization of a physical concentration process for inulin. *J. Food. Eng.* 80, 832–838. doi: [10.1016/j.jfoodeng.2006.07.012](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.012).
- Lemcke, K., and Schmülling, T. (1998). A putative *rolB* gene homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* TR-DNA has different morphogenetic activity in tobacco than *rolB*. *Plant Mol. Biol.* 36, 803–808. doi: [10.1023/A:1005905327898](https://doi.org/10.1023/A:1005905327898).
- Leporatti, M. L., and Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J. Ethnopharmacol.* 87, 123–142. doi: [10.1016/S0378-8741\(03\)00047-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00047-3).
- Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM (Preprint). Available at: <http://arxiv.org/abs/1303.3997> [Accessed January 10, 2023].
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., and Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 4692–4696. doi: [10.1073/pnas.072090199](https://doi.org/10.1073/pnas.072090199).
- Lin, C., Hsu, C., Yang, L., Lee, L., Fu, J., Cheng, Q., et al. (2018). Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnol. J.* 16, 1295–1310. doi: [10.1111/pbi.12870](https://doi.org/10.1111/pbi.12870).
- Lin, Y. (2017). Industrial applications of plant secondary metabolites (Thèse).

- Liu, Q., Majdi, M., Cankar, K., Goedbloed, M., Charnikhova, T., Verstappen, F. W. A., et al. (2011). Reconstitution of the costunolide biosynthetic pathway in yeast and *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE* 6, e23255. doi: [10.1371/journal.pone.0023255](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023255).
- Liu, Q., Beyraghdar Kashkooli, A., Manzano, D., Pateraki, I., Richard, L., Kolkman, P., et al. (2018). Kauniolide synthase is a P450 with unusual hydroxylation and cyclization-elimination activity. *Nat. Commun.* 9, 1–13. doi: [10.1038/s41467-018-06565-8](https://doi.org/10.1038/s41467-018-06565-8).
- Liu, Z., Dong, H., Cui, Y., Cong, L., and Zhang, D. (2020). Application of different types of CRISPR/Cas-based systems in bacteria. *Microb. Cell Factories* 19, 172. doi: [10.1186/s12934-020-01431-z](https://doi.org/10.1186/s12934-020-01431-z).
- Loi, M. C., Maxia, L., and Maxia, A. (2005). Ethnobotanical comparison between the villages of Escolca and Lotzorai (Sardinia, Italy). *J. Herbs Spices Med. Plants* 11, 67–84. doi: [10.1300/J044v11n03_07](https://doi.org/10.1300/J044v11n03_07).
- Lossow, K., Hübner, S., Roudnitzky, N., Slack, J. P., Pollastro, F., Behrens, M., et al. (2016). Comprehensive analysis of mouse bitter taste receptors reveals different molecular receptive ranges for orthologous receptors in mice and humans. *J. Biol. Chem.* 291, 15358–15377. doi: [10.1074/jbc.M116.718544](https://doi.org/10.1074/jbc.M116.718544).
- Luo, F., Li, Q., Yu, L., Wang, C., and Qi, H. (2020). High concentrations of CPPU promotes cucurbitacin B accumulation in melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino) fruit by inducing transcription factor *CmBt*. *Plant Physiol. and Biochem.* 154, 770–781. doi: [10.1016/j.plaphy.2020.05.033](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.033).
- Łuczaj, Ł. J. (2012). A relic of medieval folklore: Corpus Christi Octave herbal wreaths in Poland and their relationship with the local pharmacopoeia. *J. Ethnopharmacol.* 142, 228–240. doi: [10.1016/j.jep.2012.04.049](https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.04.049).
- Ma, X., and Liu, Y.-G. (2016). CRISPR/Cas9-based multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 115, 31.6.1-31.6.21. doi: [10.1002/cpmb.10](https://doi.org/10.1002/cpmb.10).
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., et al. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res.* 50, W276–W279. doi: [10.1093/nar/gkac240](https://doi.org/10.1093/nar/gkac240).
- Maher, M. F., Nasti, R. A., Vollbrecht, M., Starker, C. G., Clark, M. D., and Voytas, D. F. (2020). Plant gene editing through *de novo* induction of meristems. *Nat. Biotechnol.* 38, 84–89. doi: [10.1038/s41587-019-0337-2](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0337-2).
- Mai, F., and Glomb, M. A. (2016). Structural and sensory characterization of novel sesquiterpene lactones from iceberg lettuce. *J. Agric. Food Chem.* 64, 295–301. doi: [10.1021/acs.jafc.5b05128](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05128).
- Malarz, J., Stojakowska, A., and Kisiel, W. (2013). Long-term cultured hairy roots of chicory—a rich source of hydroxycinnamates and 8-deoxylactucin glucoside. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 1589–1601. doi: [10.1007/s12010-013-0446-1](https://doi.org/10.1007/s12010-013-0446-1).
- Mares, D., Romagnoli, C., Tosi, B., Andreotti, E., Chillemi, G., and Poli, F. (2005). Chicory extracts from *Cichorium intybus* L. as potential antifungals. *Mycopathologia* 160, 85–91. doi: [10.1007/s11046-004-6635-2](https://doi.org/10.1007/s11046-004-6635-2).
- Massoud, I., Amin, A., and Elgindy, A. (2009). Chemical and technological studies on chicory (*Cichorium intybus* L) and its applications in some functional food. *J. Adv. Agric. Res.* 14, 22.

- Mathieu, A.-S., Périlleux, C., Jacquemin, G., Renard, M.-E., Lutts, S., and Quinet, M. (2020). Impact of vernalization and heat on flowering induction, development and fertility in root chicory (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*). *J. Plant Physiol.* 254, 153272. doi: [10.1016/j.jplph.2020.153272](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153272).
- Matsuo, K., DeMilo, A. B., Schroder, R. F. W., and Martin, P. A. W. (1999). Rapid high-performance liquid chromatography method to quantitate elaterinide in juice and reconstituted residues from a bitter mutant of Hawkesbury watermelon. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2755–2759. doi: [10.1021/jf9811572](https://doi.org/10.1021/jf9811572).
- Mauro, M. L., and Bettini, P. P. (2021). *Agrobacterium rhizogenes rolB* oncogene: An intriguing player for many roles. *Plant Physiol. Biochem.* 165, 10–18. doi: [10.1016/j.plaphy.2021.04.037](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.037).
- Md Setamam, N., Jaafar Sidik, N., Abdul Rahman, Z., and Che Mohd Zain, C. R. (2014). Induction of hairy roots by various strains of *Agrobacterium rhizogenes* in different types of *Capsicum* species explants. *BMC Res. Notes* 7, 414. doi: [10.1186/1756-0500-7-414](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-414).
- Meyer, B. N., Heinstejn, P. F., Burnouf-Radosevich, M., Delfel, N. E., and McLaughlin, J. L. (1990). Bioactivity-directed isolation and characterization of quinoside A: one of the toxic/bitter principles of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J. Agric. Food Chem.* 38, 205–208. doi: [10.1021/jf00091a045](https://doi.org/10.1021/jf00091a045).
- Miano, J. M., Zhu, Q. M., and Lowenstein, C. J. (2016). A CRISPR path to engineering new genetic mouse models for cardiovascular research. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1058–1075. doi: [10.1161/ATVBAHA.116.304790](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.304790).
- Milala, J., Grzelak, K., Król, B., Juśkiewicz, J., and Zduńczyk, Z. (2009). Composition and properties of chicory extracts rich in fructans and polyphenols. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 59, 35–43.
- Miraldi, E., Ferri, S., and Mostaghimi, V. (2001). Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *J. Ethnopharmacol.* 75, 77–87. doi: [10.1016/S0378-8741\(00\)00381-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00381-0).
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182. doi: [10.1007/s00239-004-0046-3](https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3).
- Mulabagal, V., Wang, H., Ngouajio, M., and Nair, M. G. (2009). Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (*Cichorium intybus*) varieties. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 47–53. doi: [10.1007/s00217-009-1144-7](https://doi.org/10.1007/s00217-009-1144-7).
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).
- Nakayasu, M., Akiyama, R., Lee, H. J., Osakabe, K., Osakabe, Y., Watanabe, B., et al. (2018). Generation of α -solanine-free hairy roots of potato by CRISPR/Cas9 mediated genome editing of the St16DOX gene. *Plant Physiol. Biochem.* 131, 70–77. doi: [10.1016/j.plaphy.2018.04.026](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.026).
- Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., and Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Ind. Crops Prod.* 24, 87–94. doi: [10.1016/j.indcrop.2006.03.013](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.013).

- Nekrasov, V., Staskawicz, B., Weigel, D., Jones, J. D. G., and Kamoun, S. (2013). Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* 31, 691–693. doi: [10.1038/nbt.2655](https://doi.org/10.1038/nbt.2655).
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. P., and Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106, 381–390. doi: [10.1016/S0092-8674\(01\)00451-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00451-2).
- Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J. P., et al. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature* 416, 199–202. doi: [10.1038/nature726](https://doi.org/10.1038/nature726).
- Nguyen, D. T., Göpfert, J. C., Ikezawa, N., Macnevin, G., Kathiresan, M., Conrad, J., et al. (2010). Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in Asteraceae. *J. Biol. Chem.* 285, 16588–16598. doi: [10.1074/jbc.M110.111757](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111757).
- Niedz, R. P., McKendree, W. L., and Shatters, R. C. (2003). Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and regeneration of transformed plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39, 586–594. doi: [10.1079/IVP2003463](https://doi.org/10.1079/IVP2003463).
- Nirmala, M. J., Samundeeswari, A., and Sankar, P. D. (2011). Natural plant resources in anti-cancer therapy - A review. *Res. Plant Biol.* 1, 01–14.
- Noble, A. C. (1994). Bitterness in wine. *Physiol. Behav.* 56, 1251–1255. doi: [10.1016/0031-9384\(94\)90373-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90373-5).
- Nor, N. D. M., Lignou, S., Bell, L., Houston-Price, C., Harvey, K., and Methven, L. (2020). The relationship between glucosinolates and the sensory characteristics of steamed-pureed turnip (*Brassica rapa* subsp. *rapa* L.). *Foods* 9, 1719. doi: [10.3390/foods9111719](https://doi.org/10.3390/foods9111719).
- Ohkuri, T., Yasumatsu, K., Horio, N., Jyotaki, M., Margolskee, R. F., and Ninomiya, Y. (2009). Multiple sweet receptors and transduction pathways revealed in knockout mice by temperature dependence and gurmarin sensitivity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R960–R971. doi: [10.1152/ajpregu.91018.2008](https://doi.org/10.1152/ajpregu.91018.2008).
- Okabe, H., Miyahara, Y., and Yamauchi, T. (1982). Studies on the constituents of *Momordica charantia* L. IV. Characterization of the new cucurbitacin glycosides of the immature fruits--structures of the bitter glycosides, momordicosides K and L. *Chem. Pharm. Bull.* 30, 4334–4340. doi: [10.1248/cpb.30.4334](https://doi.org/10.1248/cpb.30.4334).
- Osbaldeston, T. A., and Wood, R. P. (2000). *The Herbal of Dioscorides The Greek*. Johannesburg: IBIDIS Press.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., and Artam Tarhan, E. (2013). “*Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and its biotechnological applications in crops,” in *Crop Improvement*, eds. K. R. Hakeem, P. Ahmad, and M. Ozturk (Boston, MA: Springer US), 1–48. doi: [10.1007/978-1-4614-7028-1_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7028-1_1).
- Panero, J. L., and Funk, V. A. (2008). The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. *Mol. Phylogenetics Evol.* 47, 757–782. doi: [10.1016/j.ympev.2008.02.011](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.02.011).

- Pasini, F., Verardo, V., Cerretani, L., Caboni, M. F., and D'Antuono, L. F. (2011). Rocket salad (*Diplotaxis* and *Eruca* spp.) sensory analysis and relation with glucosinolate and phenolic content. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2858–2864. doi: [10.1002/jsfa.4535](https://doi.org/10.1002/jsfa.4535).
- Pavlova, O. A., Matveyeva, T. V., and Lutova, L. A. (2014). *rol*-Genes of *Agrobacterium rhizogenes*. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 4, 137–145. doi: [10.1134/S2079059714020063](https://doi.org/10.1134/S2079059714020063).
- Pazola, Z. (1987). "The chemistry of chicory and chicory-product beverages," in *Coffee Volume 5: Related Beverages*. (England: Elsevier Applied Science Publishers LTD).
- Peña-Espinoza, M., Boas, U., Williams, A. R., Thamsborg, S. M., Simonsen, H. T., and Enemark, H. L. (2015). Sesquiterpene lactone containing extracts from two cultivars of forage chicory (*Cichorium intybus*) show distinctive chemical profiles and in vitro activity against *Ostertagia ostertagi*. *Int. J. Parasitol-Drug* 5, 191–200. doi: [10.1016/j.ijpddr.2015.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.10.002).
- Peña-Espinoza, M., Williams, A. R., Thamsborg, S. M., Simonsen, H. T., and Enemark, H. L. (2017). Anthelmintic effects of forage chicory (*Cichorium intybus*) against free-living and parasitic stages of *Cooperia oncophora*. *Vet. Parasitol.* 243, 204–207. doi: [10.1016/j.vetpar.2017.07.008](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.008).
- Petrović, J., Stojković, D., and Soković, M. (2019). Terpene core in selected aromatic and edible plants: Natural health improving agents. *Adv. Food Nutr. Res.* 90, 423–451. doi: [10.1016/bs.afnr.2019.02.009](https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.009).
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N., and Bednarek, P. (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytol.* 206, 948–964. doi: [10.1111/nph.13325](https://doi.org/10.1111/nph.13325).
- Pickenhagen, W., Dietrich, P., Keil, B., Polonsky, J., Nouaille, F., and Lederer, E. (1975). Identification of the bitter principle of cocoa. *Helv. Chim. Acta* 58, 1078–1086. doi: [10.1002/hlca.19750580411](https://doi.org/10.1002/hlca.19750580411).
- Pieroni, A. (2000). Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *J. Ethnopharmacol.* 70, 235–273. doi: [10.1016/S0378-8741\(99\)00207-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00207-X).
- Pieroni, A., Quave, C., Nebel, S., and Heinrich, M. (2002). Ethnopharmacy of the ethnic Albanians (Arbëreshë) of northern Basilicata, Italy. *Fitoterapia* 73, 217–241. doi: [10.1016/S0367-326X\(02\)00063-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00063-1).
- Poli, F., Sacchetti, G., Tosi, B., Fogagnolo, M., Chillemi, G., Lazzarin, R., et al. (2002). Variation in the content of the main guaianolides and sugars in *Cichorium intybus* var. "Rosso di Chioggia" selections during cultivation. *Food Chem.* 76, 139–147. doi: [10.1016/S0308-8146\(01\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00254-0).
- Poplin, R., Ruano-Rubio, V., DePristo, M. A., Fennell, T. J., Carneiro, M. O., Van der Auwera, G. A., et al. (2017). Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples (Preprint). doi: [10.1101/201178](https://doi.org/10.1101/201178).
- Price, K. R., and Fenwick, G. R. (1984). Soyasaponin I, a compound possessing undesirable taste characteristics isolated from the dried pea (*Pisum sativum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 35, 887–892. doi: [10.1002/jsfa.2740350812](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740350812).
- Price, K. R., Dupont, M. S., Shepherd, R., Chan, H. W.-S., and Fenwick, G. R. (1990). Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops—coloured lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus*). *J. Sci. Food Agric.* 53, 185–192. doi: [10.1002/jsfa.2740530206](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740530206).

- Puhlmann, M.-L., and de Vos, W. M. (2020). Back to the roots: revisiting the use of the fiber-rich *Cichorium intybus* L. taproots. *Adv. Nutr.* 11, 878–889. doi: [10.1093/advances/nmaa025](https://doi.org/10.1093/advances/nmaa025).
- Purewal, S. S., and Sandhu, K. S. (2021). Debitting of citrus juice by different processing methods: A novel approach for food industry and agro-industrial sector. *Sci. Hortic.* 276, 109750. doi: [10.1016/j.scienta.2020.109750](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109750).
- Pushparaj, P. N., Low, H. K., Manikandan, J., Tan, B. K. H., and Tan, C. H. (2007). Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 111, 430–434. doi: [10.1016/j.jep.2006.11.028](https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.028).
- Pyrek, J. St. (1985). Sesquiterpene lactones of *Cichorium intybus* and *Leontodon autumnalis*. *Phytochemistry* 24, 186–188. doi: [10.1016/S0031-9422\(00\)80838-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80838-9).
- Qi, J., Liu, X., Shen, D., Miao, H., Xie, B., Li, X., et al. (2013). A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nat. Genet.* 45, 1510–1515. doi: [10.1038/ng.2801](https://doi.org/10.1038/ng.2801).
- Quispe-Fuentes, I., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Lemus-Mondaca, R., Lozano, M., and Ah-Hen, K. (2013). A kinetic approach to saponin extraction during washing of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.) seeds. *J. Food Process. Eng.* 36, 202–210. doi: [10.1111/j.1745-4530.2012.00673.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2012.00673.x).
- Rakoczy-Trojanowska, M. (2002). Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7, 849–858.
- Rambaud, C., Dubois, J., and Vasseur, J. (1990). Some factors related to protoplast culture and plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of Magdeburg chicory (*Cichorium intybus* L. var. Magdeburg). *Agronomie* 10, 767–772. doi: [10.1051/agro:19900908](https://doi.org/10.1051/agro:19900908).
- Rambaud, C., and Vasseur, J. (2001). “Somatic hybridization in *Cichorium intybus* L. (Chicory),” in *Somatic hybridization in crop improvement II Biotechnology in Agriculture et Crop.*, eds. T. Nagata and Y. P. S. Bajaj (Berlin, Germany: Springer).
- Reddy, C. S., Vijayalakshmi, M., Kaul, T., Islam, T., and Reddy, M. K. (2015). Improving flavour and quality of tomatoes by expression of synthetic gene encoding sweet protein monellin. *Mol. Biotechnol.* 57, 448–453. doi: [10.1007/s12033-015-9838-5](https://doi.org/10.1007/s12033-015-9838-5).
- 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, 2225–2231. doi: [10.1016/S0031-9422\(00\)83015-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83015-0).
- Reyes-Chin-Wo, S., Wang, Z., Yang, X., Kozik, A., Arikiti, S., Song, C., et al. (2017). Genome assembly with *in vitro* proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. *Nat. Commun.* 8, 14953. doi: [10.1038/ncomms14953](https://doi.org/10.1038/ncomms14953).
- Rick, C. M., Uhlig, J. W., and Jones, A. D. (1994). High alpha-tomatine content in ripe fruit of Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: developmental and genetic aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 12877–12881. doi: [10.1073/pnas.91.26.12877](https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12877).
- Ripoll, C., Schmidt, B. M., Ilic, N., Poulev, A., Dey, M., Kurmukov, A. G., et al. (2007). Anti-inflammatory effects of a sesquiterpene lactone extract from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Nat. Prod. Com.* 2, 717–722. doi: [10.1177/1934578X0700200702](https://doi.org/10.1177/1934578X0700200702).

- Roberfroid, M. B. (2000). A European consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutrition* 16, 689–691. doi: [10.1016/S0899-9007\(00\)00329-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00329-4).
- Roberfroid, M. B. (2007). Inulin-type fructans: Functional food ingredients. *J. Nutr.* 137, 2493S-2502S. doi: [10.1093/jn/137.11.2493S](https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2493S).
- Roland, W. S. U., Gouka, R. J., Gruppen, H., Driesse, M., van Buren, L., Smit, G., et al. (2014). 6-methoxyflavanones as bitter taste receptor blockers for hTAS2R39. *PLoS ONE* 9, e94451. doi: [10.1371/journal.pone.0094451](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094451).
- Roland, W. S. U., Vincken, J.-P., Gouka, R. J., van Buren, L., Gruppen, H., and Smit, G. (2011). Soy isoflavones and other isoflavonoids activate the human bitter taste receptors hTAS2R14 and hTAS2R39. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11764–11771. doi: [10.1021/jf202816u](https://doi.org/10.1021/jf202816u).
- Rubiolo, P., Matteodo, M., Bicchi, C., Appendino, G., Gnani, G., Bertera, C., et al. (2009). Chemical and biomolecular characterization of *Artemisia umbelliformis* Lam., an important ingredient of the alpine liqueur “genepi.” *J. Agric. Food Chem.* 57, 3436–3443. doi: [10.1021/jf803915v](https://doi.org/10.1021/jf803915v).
- Rymal, K. S., Chambliss, O. L., Bond, M. D., and Smith, D. A. (1984). Squash containing toxic cucurbitacin compounds occurring in California and Alabama. *J. Food Prot.* 47, 270–271. doi: [10.4315/0362-028X-47.4.270](https://doi.org/10.4315/0362-028X-47.4.270).
- Saksi, N. (1985). Culture et potentialités de régénération de protoplastes de feuilles de *Cichorium intybus* L. var witloof (Thèse).
- Saltveit, M. E. (2017). “Synthesis and metabolism of phenolic compounds,” in *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, ed. E. M. Yahia (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 115–124. doi: [10.1002/9781119158042.ch5](https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch5).
- Sánchez-Pérez, R., Jørgensen, K., Olsen, C. E., Dicenta, F., and Møller, B. L. (2008). Bitterness in almonds. *Plant Physiol.* 146, 1040–1052. doi: [10.1104/pp.107.112979](https://doi.org/10.1104/pp.107.112979).
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 39, 9275–9282. doi: [10.1093/nar/gkr606](https://doi.org/10.1093/nar/gkr606).
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., and Saukel, J. (2011). Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* 133, 1051–1076. doi: [10.1016/j.jep.2010.11.033](https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.033).
- Šavikin, K., Zdunić, G., Menković, N., Živković, J., Čujić, N., Tereščenko, M., et al. (2013). Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district. *J. Ethnopharmacol.* 146, 803–810. doi: [10.1016/j.jep.2013.02.006](https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.02.006).
- Scaglione, D., Reyes-Chin-Wo, S., Acquadro, A., Froenicke, L., Portis, E., Beitel, C., et al. (2016). The genome sequence of the outbreeding globe artichoke constructed de novo incorporating a phase-aware low-pass sequencing strategy of F1 progeny. *Sci. Rep.* 6, 19427. doi: [10.1038/srep19427](https://doi.org/10.1038/srep19427).
- Schenck, G., and Graf, H. (1936). Zur kenntnis des lactucariums. (I. Mitteilung.). *Arch. Pharm.* 274, 537–542. doi: [10.1002/ardp.19362740904](https://doi.org/10.1002/ardp.19362740904). (allemand)

- Schenck, G., and Graf, H. (1939). Die bitterstoffgeschmacksbestimmung der bitterstoffe des milchsafte von *Lactuca virosa*. (7. Mitteilung zur kenntnis der bitterstoffe des milchsafte von *Lactuca virosa*). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 277, 257–261. doi: [10.1002/ardp.19392770604](https://doi.org/10.1002/ardp.19392770604). (allemand)
- Schonhof, I., Krumbein, A., and Brückner, B. (2004). Genotypic effects on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower. *Food* 48, 25–33. doi: [10.1002/food.200300329](https://doi.org/10.1002/food.200300329).
- Seaman, F. C. (1982). Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *Bot. Rev.* 48, 121–595.
- Seninde, D. R., and Chambers, E. (2020). Coffee flavor: a review. *Beverages* 6, 44. doi: [10.3390/beverages6030044](https://doi.org/10.3390/beverages6030044).
- Seo, M. W., Yang, D. S., Kays, S. J., Lee, G. P., and Park, K. W. (2009). Sesquiterpene lactones and bitterness in korean leaf lettuce cultivars. *HortScience* 44, 246–249. doi: [10.21273/HORTSCI.44.2.246](https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.2.246).
- Sessa, R. A., Bennett, M. H., Lewis, M. J., Mansfield, J. W., and Beale, M. H. (2000). Metabolite profiling of sesquiterpene lactones from *Lactuca* species: Major latex components are novel oxalate and sulfate conjugates of lactucin and its derivatives. *J. Biol. Chem.* 275, 26877–26884. doi: [10.1074/jbc.M000244200](https://doi.org/10.1074/jbc.M000244200).
- Seto, M., Miyase, T., Umehara, K., Ueno, A., Hirano, Y., and Otani, N. (1988). Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 2423–2429.
- Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., and Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *J. Ethnopharmacol.* 75, 95–115. doi: [10.1016/S0378-8741\(00\)00399-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00399-8).
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., et al. (2013). Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31, 686–688. doi: [10.1038/nbt.2650](https://doi.org/10.1038/nbt.2650).
- Shang, Y., Ma, Y., Zhou, Y., Zhang, H., Duan, L., Chen, H., et al. (2014). Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber. *Science* 346, 1084–1088. doi: [10.1126/science.1259215](https://doi.org/10.1126/science.1259215).
- Shen, Q., Zhang, L., Liao, Z., Wang, S., Yan, T., Shi, P., et al. (2018). The genome of *Artemisia annua* provides insight into the evolution of asteraceae family and artemisinin biosynthesis. *Mol. Plant* 11, 776–788. doi: [10.1016/j.molp.2018.03.015](https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.03.015).
- Sindhu, S., Maya, P., and Indira, T. N. (2012). A method for preparation of mustard (*Brassica juncea*) powder with retained pungency and reduced bitterness. *LWT* 49, 42–47. doi: [10.1016/j.lwt.2012.04.016](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.016).
- Singh, B., and Sharma, R. A. (2015). Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech* 5, 129–151. doi: [10.1007/s13205-014-0220-2](https://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2).
- Sinha, A., Wetten, A. C., and Caligari, P. D. S. (2003). Optimisation of protoplast production in white lupin. *Biol. plant.* 46, 21–25. doi: [10.1023/A:1027316511865](https://doi.org/10.1023/A:1027316511865).
- Slack, J. P., Brockhoff, A., Batram, C., Menzel, S., Sonnabend, C., Born, S., et al. (2010). Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist. *Curr. Biol.* 20, 1104–1109. doi: [10.1016/j.cub.2010.04.043](https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.043).

- Slightom, J. L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., and Tepfer, D. (1986). Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames. *J. Biol. Chem.* 261, 108–121. doi: [10.1016/S0021-9258\(17\)42439-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42439-2).
- Sołowiej, B., Glibowski, P., Muszyński, S., Wydrych, J., Gawron, A., and Jeliński, T. (2015). The effect of fat replacement by inulin on the physicochemical properties and microstructure of acid casein processed cheese analogues with added whey protein polymers. *Food Hydrocoll.* 44, 1–11. doi: [10.1016/j.foodhyd.2014.08.022](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.022).
- Sotelo, T., Velasco, P., Soengas, P., Rodríguez, V. M., and Cartea, M. E. (2016). Modification of leaf glucosinolate contents in *Brassica oleracea* by divergent selection and effect on expression of genes controlling glucosinolate pathway. *Front. Plant Sci.* 7. doi: [10.3389/fpls.2016.01012](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01012).
- Spina, M., Cuccioloni, M., Sparapani, L., Acciarri, S., Eleuteri, A. M., Fioretti, E., et al. (2008). Comparative evaluation of flavonoid content in assessing quality of wild and cultivated vegetables for human consumption. *J. Sci. Food Agric.* 88, 294–304. doi: [10.1002/jsfa.3089](https://doi.org/10.1002/jsfa.3089).
- Stevens, C. V., Meriggi, A., and Booten, K. (2001). Chemical modification of inulin, a valuable renewable resource, and its industrial applications. *Biomacromolecules* 2, 1–16. doi: [10.1021/bm005642t](https://doi.org/10.1021/bm005642t).
- Street, R. A., Sidana, J., and Prinsloo, G. (2013). *Cichorium intybus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2013, 13. doi: [10.1155/2013/579319](https://doi.org/10.1155/2013/579319).
- Sun, H.-J., Cui, M., Ma, B., and Ezura, H. (2006). Functional expression of the taste-modifying protein, miraculin, in transgenic lettuce. *FEBS Lett.* 580, 620–626. doi: [10.1016/j.febslet.2005.12.080](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.12.080).
- Sun, L.-Y., Touraud, G., Charbonnier, C., and Tepfer, D. (1991). Modification of phenotype in Belgian endive (*Cichorium intybus*) through genetic transformation by *Agrobacterium rhizogenes*: conversion from biennial to annual flowering. *Transgenic Res.* 1, 14–22. doi: [10.1007/BF02512992](https://doi.org/10.1007/BF02512992).
- Sun-Waterhouse, D., and Wadhwa, S. S. (2013). Industry-relevant approaches for minimising the bitterness of bioactive compounds in functional foods: a review. *Food Bioprocess. Technol.* 6, 607–627. doi: [10.1007/s11947-012-0829-2](https://doi.org/10.1007/s11947-012-0829-2).
- Szopa, A., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Elansary, H. O., Al-Mana, F. A., et al. (2020). *Artemisia absinthium* L.—importance in the history of medicine, the latest advances in phytochemistry and therapeutical, cosmetological and culinary uses. *Plants* 9, 1063. doi: [10.3390/plants9091063](https://doi.org/10.3390/plants9091063).
- Szwacka, M., Krzymowska, M., Osuch, A., Kowalczyk, M. E., and Malepszy, S. (2002). Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*. *Acta Physiol. Plant.* 24, 173–185. doi: [10.1007/s11738-002-0009-5](https://doi.org/10.1007/s11738-002-0009-5).
- Tang, Y., and Fu, Y. (2018). Class 2 CRISPR/Cas: an expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. *Cell Biosci.* 8, 59. doi: [10.1186/s13578-018-0255-x](https://doi.org/10.1186/s13578-018-0255-x).
- Testone, G., Mele, G., di Giacomo, E., Tenore, G. C., Gonnella, M., Nicolodi, C., et al. (2019). Transcriptome driven characterization of curly- and smooth-leaved endives reveals molecular differences in the sesquiterpenoid pathway. *Hortic. Res.* 6, 1. doi: [10.1038/s41438-018-0066-6](https://doi.org/10.1038/s41438-018-0066-6).

- Tsatsaragkou, K., Methven, L., Chatzifragkou, A., and Rodriguez-Garcia, J. (2021). The functionality of inulin as a sugar replacer in cakes and biscuits; highlighting the influence of differences in degree of polymerisation on the properties of cake batter and product. *Foods* 10, 951. doi: [10.3390/foods10050951](https://doi.org/10.3390/foods10050951).
- Twarogowska, A., Van Droogenbroeck, B., and Fraeye, I. (2022). Application of Belgian endive (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) dietary fiber concentrate to improve nutritional value and functional properties of plant-based burgers. *Food Biosci.* 48, 101825. doi: [10.1016/j.fbio.2022.101825](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101825).
- Twarogowska, A., Van Poucke, C., and Van Droogenbroeck, B. (2020). Upcycling of Belgian endive (*Cichorium intybus* var. *foliosum*) by-products. Chemical composition and functional properties of dietary fibre root powders. *Food Chem.* 332, 127444. doi: [10.1016/j.foodchem.2020.127444](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127444).
- Tetik, F., Civelek, S., and Cakilcioglu, U. (2013). Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). *J. Ethnopharmacol.* 146, 331–346. doi: [10.1016/j.jep.2012.12.054](https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.12.054).
- Tomchik, S. M., Berg, S., Kim, J. W., Chaudhari, N., and Roper, S. D. (2007). Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J. Neurosci.* 27, 10840–10848. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1863-07.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1863-07.2007).
- Travers, J. B., and Norgren, R. (1986). Electromyographic analysis of the ingestion and rejection of sapid stimuli in the rat. *Behav. Neurosci.* 100, 544–555. doi: [doi: 10.1037//0735-7044.100.4.544](https://doi.org/10.1037//0735-7044.100.4.544).
- Uğurlu, S., Okumuş, E., and Bakkalbaşı, E. (2020). Reduction of bitterness in green walnuts by conventional and ultrasound-assisted maceration. *Ultrasonics Sonochem.* 66, 105094. doi: [10.1016/j.ultsonch.2020.105094](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105094).
- Uluwaduge, D. I. (2018). Glycoalkaloids, bitter tasting toxicants in potatoes: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 3, 188–193.
- Van Beek, T. A., Maas, P., King, B. M., Leclercq, E., Voragen, A. G. J., and De Groot, A. (1990). Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1035–1038. doi: [10.1021/jf00094a026](https://doi.org/10.1021/jf00094a026).
- Van den Ende, W., and Van Laere, A. (1996). De-novo synthesis of fructans from sucrose in vitro by a combination of two purified enzymes (sucrose: sucrose 1-fructosyl transferase and fructan: fructan 1-fructosyl transferase) from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 200, 335–342. doi: [10.1007/BF00200301](https://doi.org/10.1007/BF00200301).
- Van Doorn, H. E., van der Kruk, G. C., van Holst, G.-J., Raaijmakers-Ruijs, N. C. M. E., Postma, E., Groeneweg, B., et al. (1998). The glucosinolates sinigrin and progoitrin are important determinants for taste preference and bitterness of Brussels sprouts. *J. Sci. Food Agric.* 78, 30–38. doi: [10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199809\)78:1<30::AID-JSFA79>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199809)78:1<30::AID-JSFA79>3.0.CO;2-N).
- Van Laere, A., and Van Den Ende, W. (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant Cell Environ.* 25, 803–813. doi: [10.1046/j.1365-3040.2002.00865.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00865.x).
- Van Wyk, B. E. van, Oudtshoorn, B., and Gericke, N. (1997). *Medicinal plants of South Africa*. Pretoria, South Africa: Briza.

- Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., and Kinnamon, S. C. (2008). Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci.* 9, 1. doi: [10.1186/1471-2202-9-1](https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-1).
- Vázquez-Araújo, L., Chambers, E., Adhikari, K., and Carbonell-Barrachina, A. A. (2011). Physico-chemical and sensory properties of pomegranate juices with pomegranate albedo and carpellar membranes homogenate. *LWT* 44, 2119–2125. doi: [10.1016/j.lwt.2011.07.014](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.014).
- Vavilov, N. I., Vavilov, M. I., Vavilov, N. Í., Filatenko, A. A., Dorofeev, V. F., Dorofeev, V. F., et al. (1992). *Origin and Geography of Cultivated Plants*. Cambridge University Press.
- Verma, R., Rawat, A., Ganie, S. A., Agnihotri, R. K., Sharma, R., Mahajan, S., et al. (2013). *In vitro* antibacterial activity of *Cichorium intybus* against some pathogenic bacteria. *Br. J. Pharma. Res.* 3, 767–775. doi: [10.9734/BJPR/2013/3887](https://doi.org/10.9734/BJPR/2013/3887).
- Vilaine, F., and Casse-Delbart, F. (1987). A new vector derived from *Agrobacterium rhizogenes* plasmids: a micro-Ri plasmid and its use to construct a mini-Ri plasmid. *Gene* 55, 105–114. doi: [10.1016/0378-1119\(87\)90253-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90253-8).
- Vladimirov, I. A., Matveeva, T. V., and Lutova, L. A. (2015). Opine biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Russ. J. Genet.* 51, 121–129. doi: [10.1134/S1022795415020167](https://doi.org/10.1134/S1022795415020167).
- Volkova, A., Sysoev, V., Blinova, O., Trots, A., and Prazdnichkova, N. (2019). Innovative technologies of using promising phyto-fortificants in bakery products of high nutritional value. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 403, 012119. doi: [10.1088/1755-1315/403/1/012119](https://doi.org/10.1088/1755-1315/403/1/012119).
- Walter, W. M., Fleming, H. P., and Etchells, J. L. (1973). Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Appl. Microbiol.* 26, 773–776. doi: [10.1128/am.26.5.773-776.1973](https://doi.org/10.1128/am.26.5.773-776.1973).
- Wang, Q., Quan, S., and Xiao, H. (2019). Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply. *Bioresour. Bioprocess.* 6, 6. doi: [10.1186/s40643-019-0242-z](https://doi.org/10.1186/s40643-019-0242-z).
- Wedge, D. E., Galindo, J. C. G., and Macías, F. A. (2000). Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry* 53, 747–757. doi: [10.1016/S0031-9422\(00\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00008-X).
- White, F. F., Taylor, B. H., Huffman, G. A., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1985). Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* 164, 33–44. doi: [10.1128/jb.164.1.33-44.1985](https://doi.org/10.1128/jb.164.1.33-44.1985).
- Willeman, H. (2016). Contribution à la recherche des composés impliqués dans l’amertume de la racine de chicorée - Approches métabolomique et sensorielle de l’influence de la torréfaction (Thèse).
- Witty, M. (1990). Preprothaumatin II is processed to biological activity in *Solanum tuberosum*. *Biotechnol. Lett.* 12, 131–136. doi: [10.1007/BF01022429](https://doi.org/10.1007/BF01022429).
- Woo, J. W., Kim, J., Kwon, S. I., Corvalán, C., Cho, S. W., Kim, H., et al. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat. Biotechnol.* 33, 1162–1164. doi: [10.1038/nbt.3389](https://doi.org/10.1038/nbt.3389).

- Wouters, F. C., Blanchette, B., Gershenzon, J., and Vassão, D. G. (2016). Plant defense and herbivore counter-defense: benzoxazinoids and insect herbivores. *Phytochem. Rev.* 15, 1127–1151. doi: [10.1007/s11101-016-9481-1](https://doi.org/10.1007/s11101-016-9481-1).
- Xie, K., and Yang, Y. (2013). RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. *Mol. Plant* 6, 1975–1983. doi: [10.1093/mp/sst119](https://doi.org/10.1093/mp/sst119).
- Xu, Y.-Q., Zhang, Y.-N., Chen, J.-X., Wang, F., Du, Q.-Z., and Yin, J.-F. (2018). Quantitative analyses of the bitterness and astringency of catechins from green tea. *Food Chem.* 258, 16–24. doi: [10.1016/j.foodchem.2018.03.042](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.042).
- Yanagisawa, T., and Misaka, T. (2021). Characterization of the human bitter taste receptor response to sesquiterpene lactones from edible Asteraceae species and suppression of bitterness through pH control. *ACS Omega* 6, 4401–4407. doi: [10.1021/acsomega.0c05599](https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05599).
- Yang, Q., Mei, X., Wang, Z., Chen, X., Zhang, R., Chen, Q., et al. (2021). Comprehensive identification of non-volatile bitter-tasting compounds in *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. by untargeted metabolomics combined with sensory-guided fractionation technique. *Food Chem.* 347, 129085. doi: [10.1016/j.foodchem.2021.129085](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129085).
- Yashiro, T., Sugimoto, N., Sato, K., Yamazaki, T., and Tanamoto, K. (2004). Analysis of absinthin in absinth extract bittering agent. *JJFC* 11, 89–90. doi: [10.18891/JJFCS.11.2.86](https://doi.org/10.18891/JJFCS.11.2.86).
- Yasuda, M., Iwamoto, M., Okabe, H., and Yamauchi, T. (1984). Structures of momordicines I, II and III: the bitter principles in the leaves and vines of *Momordica charantia* L. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 2044–2047. doi: [10.1248/cpb.32.2044](https://doi.org/10.1248/cpb.32.2044).
- Zabaras, D., Roohani, M., Krishnamurthy, R., Cochet, M., and Delahunty, C. M. (2013). Characterisation of taste-active extracts from raw *Brassica oleracea* vegetables. *Food Funct.* 4, 592. doi: [10.1039/c2fo30192j](https://doi.org/10.1039/c2fo30192j).
- Zarroug, Y. O., Abdelkarim, A., Terras Dorra, S., Hamdaoui, G., EL Felah, M., and Hassouna, M. (2016). Biochemical characterization of tunisian *Cichorium intybus* l. roots and optimization of ultrasonic inulin extraction. *Mediterr. J. Chem.* 6, 674–685. doi: [10.13171/mjc61/01611042220-zarroug](https://doi.org/10.13171/mjc61/01611042220-zarroug).
- Zeny, E., Younis Essa, R., Bisar, B., and Metwalli, S. (2019). Effect of using chicory roots powder as a fat replacer on beef burger quality. *Slov. Vet. Zb.* 56, 509–523. doi: [10.26873/SVR-788-2019](https://doi.org/10.26873/SVR-788-2019).
- Zeng, W., Tao, H., Li, Y., Wang, J., Xia, C., Li, S., et al. (2021). The flavor of Chinese kale sprouts is affected by genotypic variation of glucosinolates and their breakdown products. *Food Chem.* 359, 129824. doi: [10.1016/j.foodchem.2021.129824](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129824).
- Zeven, A. C., and de Wet, J. M. J. (1982). Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity: excluding most ornamentals, forest trees and lower plants. 2nd edition. Wageningen: Pudoc.
- Zhang, B., Wang, Z., Han, X., Liu, X., Wang, Q., Zhang, J., et al. (2022). The chromosome-scale assembly of endive (*Cichorium endivia*) genome provides insights into the sesquiterpenoid biosynthesis. *Genomics* 114, 110400. doi: [10.1016/j.ygeno.2022.110400](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110400).

Zhang, H.-L., Dai, L.-H., Wu, Y.-H., Yu, X.-P., Zhang, Y.-Y., Guan, R.-F., et al. (2014). Evaluation of hepatocyteprotective and anti-hepatitis B virus properties of cichoric acid from *Cichorium intybus* leaves in cell culture. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1214–1220. doi: [10.1248/bpb.b14-00137](https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00137).

Zitnak, A., and Filadelfi, M. A. (1985). Estimation of taste thresholds of three potato glycoalkaloids. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18, 337–339. doi: [10.1016/S0315-5463\(85\)71970-0](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(85)71970-0).

Sites internet consultés :

Ministère de la Transition écologiques et de la Cohésion des territoires (2022). Politiques publiques, Santé environnement – Les organismes génétiquement modifiés. Available at : <https://www.ecologie.gouv.fr/organismes-genetiquement-modifies-ogm-0#:~:text=En%20France,son%20territoire%2C%20du%20ma%C3%AFs%20MON810>.

Spherical Insight & Consulting (2022). Global functional food market report - Global insights, growth, size, comparative analysis, trends and forecast, 2021-2030. Available at: <https://www.sphericalinsights.com/reports/functional-food-market>.