AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université de Lorraine

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits Environnement

Unité Mixte de Recherche 1121 Université de Lorraine-INRA

Laboratoire Agronomie et Environnement

Plant Advanced Technologies SA

THESE

Présentée en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

en Sciences Agronomiques

Caractérisation moléculaire et enzymatique d'une HCT impliquée dans la biosynthèse de dérivés d'acide caféoyl-quinique chez *Ipomoea batatas*

Par **Léonor DURIOT**

Thèse soutenue le 6 décembre 2016, devant un jury composé de :

Jean-Louis Hilbert	Professeur, Université de Lille	Rapporteur
Nathalie Guivarc'h	Professeur, Université François Rabelais, Tours	Rapporteure
Michèle Boitel-Conti	Professeur, Université de Picardie	Examinatrice
Frédéric Bourgaud	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse
Alain Hehn	Professeur, Université de Lorraine	Co-directeur de thèse

Université de Lorraine

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits Environnement

Unité Mixte de Recherche 1121 Université de Lorraine-INRA

Laboratoire Agronomie et Environnement

Plant Advanced Technologies SA

THESE

Présentée en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

en Sciences Agronomiques

Caractérisation moléculaire et enzymatique d'une HCT impliquée dans la biosynthèse de dérivés d'acide caféoyl-quinique chez *Ipomoea batatas*

Par **Léonor DURIOT**

Thèse soutenue le 6 décembre 2016, devant un jury composé de :

Jean-Louis Hilbert	Professeur, Université de Lille	Rapporteur
Nathalie Guivarc'h	Professeur, Université François Rabelais, Tours	Rapporteure
Michèle Boitel-Conti	Professeur, Université de Picardie	Examinatrice
Frédéric Bourgaud	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse
Alain Hehn	Professeur, Université de Lorraine	Co-directeur de thèse

A Jean-Noël et mamie Yvette

REMERCIEMENTS

Au terme de ces années de thèse passées au LAE, j'ai le plaisir d'exprimer mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse. Je vais tenter d'exprimer par ces quelques mots ma pleine reconnaissance envers vous.

Tout d'abord, mes remerciements s'adressent à Monsieur Jean-Louis Hilbert, professeur et directeur de recherche à l'INRA/Université de Lille, et Madame Nathalie Guivarc'h, professeur à l'Université de Tours, pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit. Je remercie également Madame Michèle Boitel-Conti pour avoir accepté d'être l'examinatrice de ce travail. C'est un honneur de bénéficier de leurs observations et je tiens à leur exprimer ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au professeur Frédéric Bourgaud, mon directeur de thèse, et au professeur Alain Hehn, mon co-directeur de thèse, de m'avoir acceptée comme doctorante et de m'avoir encadrée. Merci pour votre grande disponibilité et vos encouragements prodigués tout au long de ce travail de recherche. Votre vision critique et scientifique m'a aidée à développer mes compétences et à apprécier davantage la recherche. Fred, merci pour ton soutien dans mes moments de doutes, tes avis judicieux et tes idées constructives. Alain, merci pour avoir consacré du temps aux corrections et pour tes conseils bienveillants. Tes commentaires (qui m'ont parfois paru intenses) m'ont été d'une grande nécessité et m'ont ouverte sur de nouvelles réflexions. Je vais garder cela à l'esprit pour mes futures investigations.

Je remercie également Christophe Robin, pour avoir mis en place « la construction du projet de thèse », un exercice très enrichissant qui permet de prendre du recul sur son travail. Le projet de ma thèse a fait suite à des travaux réalisés dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Turin (Italie), par Dr. Barbara Menin, que je remercie pour m'avoir aidée au commencement.

Bien sûr, cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans l'entreprise Plant Advanced Technologies (PAT) où j'ai fait mes premiers pas dans ma carrière.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Mr Jean-Paul Fèvre, PDG de l'entreprise PAT, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour votre écoute et pour l'état d'esprit positif que vous nous inspirez. C'est un plaisir de travailler chez PAT, tant pour la convivialité générale que pour le professionnalisme de chacun. Les journées société, déménagements, et séances occasionnelles de rempotage à la serre m'ont aidée à reprendre le souffle dans les moments délicats de ma thèse.

Merci à mes responsables de chez PAT, Benoit Mignard et Paul Hannewald, pour avoir pris parti à l'initiative de cette thèse. J'ai débuté mon stage de Master sous votre aile et j'ai été très heureuse de continuer dans cette belle aventure grâce à vous.

Parce qu'on ne fait pas une thèse tout seul sans l'aide des autres au quotidien, je souhaite remercier les personnes du LAE qui ont travaillé à mes côtés depuis le début (Fazeelat, Guilhem, Barbara, Sandy, Célia, Corinna, Thibault, Joffrey) jusqu'à la fin (Alex, Romain,

Aude, Julie, Clément, Jérémy, Audray, Marianna). Merci pour votre expertise dans vos domaines respectifs. Merci Alex, mon « coach » de piste (Coyotte !), pour tes précieux conseils au labo. Tu m'as entrainée dans des courses à pied qui me paraissaient impossibles il y a un an et ça ma défoulée pendant la rédac, toujours avec autant d'humour qu'un Gaston Lagaffe ;-). Merci aussi pour ton soutien moral sans faille et ton dynamisme. Merci Sandro pour tes astuces de manips et pour tes conseils de phylogénie. Merci Romain pour les bonnes rigolades et pour tes conseils.

Je voudrais remercier les participants de la JJC ou « Journée des Jeunes Chercheurs » (Colin, Caroline, Victoire, Fred, Audray, Sandro, Hugues et Marianna). Merci d'avoir mis votre énergie et vos idées dans la concrétisation de ce projet qui fut très instructif à mon sens. Que de bons souvenirs de cette journée parfumée à la « mirabelle » ! Une expérience réussie !

Le moment est venu de saluer tous mes collègues membres actifs et sympathisants de l'équipe R&D PAT. Carole, merci pour tes conseils avisés et ta confiance. Sissi merci pour ton réconfort et ton expertise scientifique, et ta ténacité admirable ! Estelle, merci pour ton investissement dans le rôle de DP et la rigueur dans ton travail que je trouve exemplaire. Cindy (morue !!!lol), merci pour ton aide et pour nos sacrés délires, j'espère que tu ne m'en veux pas trop avec tout ce que je t'ai fais voir, et attends… !!! Léa, merci pour ta gentillesse, ta sincérité et ton écoute. Justinne, merci pour nos échappées cinématographiques et ton énergie, toujours partante pour toute aventure ! Et je remercie mes autres collègues (Adeline, Simon, Aline, Peggy, Léna, David) avec qui j'ai passé des moments très agréables et j'espère que cela continuera.

Chez PAT, il y a de la science, mais aussi de la bonne humeur et une vraie cohésion d'équipe. J'ai notamment vécu cela au cours de ma rédaction dans un bureau composé de chimistes, d'une juriste et d'un coordinateur de projets. Agnès, merci pour ton sourire et ton attitude positive. Alek, merci pour nos fous rires, et ton expertise « incroyable, comme tu dis ! » sur la partie chimie. Pierre, merci pour tes conseils et pour les courses à pied « infernales » avec Alex. Carine, merci pour les gourmandises et pour nos discussions intéressantes. Jean-François, merci pour ta bonne humeur, et ta passion partagée pour la salsa. Je m'excuse pour les vendredis où j'ai parfois laissé échapper quelques blagues, mais de voir quelques sourires se relever ou des fous rires tomber par mes soi-disant « gaffes », ça met un peu de soleil dans cette Lorraine !

Je souhaite également remercier mes autres collègues de travail chez PAT. Merci tout particulièrement à Hinde, pour ta bonne humeur communicative et ton stoïcisme face à mes surprises (un glaçon peut-être ???!!!). Et merci à Anaïs, pour ta gentillesse et ton sourire.

En dehors du contexte professionnel, il y a des personnes qui m'ont accompagnée tout au long de cette traversée. Mes amis rencontrés à Nancy, dont la bande incorrigible Max, Aurélien, Lucile, et Cécile. Merci à mes colocataires : Christoph, Tristan, Sandrine, Léa, Sandra, Julien, Anna et la petite dernière Morgane !

Enfin je remercie mes amis (depuis toujours) de Dordogne : John, merci pour m'avoir toujours redonné le sourire et pour tous nos moments partagés. Natacha, ma super amie qui savait me prêter son épaule et qui ne m'a jamais lâchée, je t'adorrree !!!

Et puis j'en viens à ma famille. Vous êtes le pilier de cette pyramide ! Mes parents qui m'ont tendrement soutenue, en dépit des difficultés qu'il a fallu relever. Je n'ai jamais pris le chemin le plus facile, mais vous m'avez fait confiance et vous avez toujours cru en moi. Merci infiniment à ma tante Maïthé et mon oncle Angel, qui ont aussi beaucoup compté pour la réussite de mes études, je vous le dois bien ! Et enfin ma cousine (et pas petite nièce !!!) Jennifer pour nos bons délires et pour ta grande ténacité que j'admire. Merci à Jacqueline, pour m'avoir considérée comme sa petite fille. Et merci à ma grand-mère, Yvette, qui m'a encore laissé des notes de piano qui trottent toujours dans ma tête.

Et enfin, au croisement de certains chemins, je pense à ceux que j'ai rencontrés et qui m'ont apporté à leur manière, leurs recommandations, leur enthousiasme et leurs encouragements pour mener à bien ce projet. Merci à vous !

SOMMAIRE

Remerciements 2

Sommaire 6

ABREVIATIONS 14

ESPECES CITEES 18

INTRODUCTION 24

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 30

1 Les métabolites secondaires : une grande diversité chez les végétaux 30

2 Les phénylpropanoïdes et dérivés 31

2.1 Structure générale des composés phénoliques 31

2.2 Les polyphénols disposent de propriétés antioxydantes reconnues 31

2.3 La voie de biosynthèse est régie par une cascade de réactions enzymatiques 32

2.4 Les principales classes de phénylpropanoïdes 35

2.4.1 Les flavonoïdes 35
2.4.2 Les stilbènes 37
2.4.3 Les coumarines 38
2.4.4 Les lignines 39
2.4.5 Les acides hydroxybenzoïques 40
2.4.6 Les acides hydroxycinnamiques 41

2.5 Les dérivés d'acide caféoyl-quinique 43

2.5.1 Description structurale des formes isomériques 44
2.5.2 Distribution dans le règne végétal 46
2.5.2.1 Les familles de plantes accumulatrices et quelques exemples de plantes médicinales 46
2.5.2.2 La localisation cellulaire et tissulaire 48
2.5.3 Rôles physiologiques dans la plante 49
2.5.3.1 Rôles anti-microbiens 49
2.5.3.2 Rôles allélopathiques 50
2.5.3.3 Autres rôles 50
2.5.4 Applications thérapeutiques 51
2.5.4.1 Antioxydant 52
2.5.4.2 Inhibiteurs d'enzymes 52
2.5.4.3 Anti-inflammatoire 53
2.5.4.4 Neuroprotecteur 53
2.5.4.5 Anti-cancer 53
2.5.4.6 Rôle anti-malarial 54
2.5.5 Voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique 55
2.5.6 Voie de biosynthèse des acides dicaféoyl-quiniques 56
2.5.7 Rôle des acyltransférases de la famille des BAHD dans la synthèse des dérivés d'acide caféique 57

2.5.7.1 Définition de la famille des transférases BAHD 57
2.5.7.2 Les motifs conservés des BAHD 58
2.5.7.3 Fonction des BAHD 59
2.5.7.4 Classification des BAHD 59
2.5.7.5 Les hydroxycinnamoyl transférases 60
2.5.7.5.1 Présentation générale 60
2.5.7.5.2 Les hydroxycinnamoyl shikimate/quinate acyltransférases (HCT et HQT) 61
2.5.7.5.2.1 Rôles dans la synthèse des acides caféoyl-quiniques 61
2.5.7.5.2.2 Rôles dans la synthèse des acides dicaféoyl-quiniques 62
2.5.7.5.2.3 L'expression spatio-temporelle des HCT et HQT 63
2.5.7.5.2.4 Etude structurale et identification des sites catalytiques pour la synthèse des acides mono- et di-caféoyl-quiniques 63
2.5.7.5.2.5 Les autres rôles et le lien avec la synthèse de lignine 64

3 *Ipomoea batatas* L (patate douce) 66
3.1 Description botanique 66
3.2 Conditions de culture 67
3.3 Distribution géographique et production 68
3.4 Valeurs nutritionnelles et propriétés médicinales 68
3.5 Une grande richesse en acides caféoyl-quiniques 69

OBJECTIFS DE LA THESE 72

MATERIEL ET METHODES 76

1 Le matériel biologique 76
1.1 Le matériel végétal 76
1.1.1 *Nicotiana tabacum* var Samsung 76
1.1.2 *Ipomoea batatas* 76
1.1.2.1 La variété 76
1.1.2.2 La culture des plantes en serre 76
1.1.3 Le prélèvement des tissus 77
1.2 Les souches bactériennes 78
1.2.1 *Escherichia coli* 78
1.2.1.1 Les souches d'*Escherichia coli* utilisées pour le clonage des gènes d'intérêt 78
1.2.1.1.1 La souche Genehogs® 78
1.2.1.1.2 La souche MC 1022 78
1.2.1.2 Les souches utilisées pour l'expression des protéines recombinantes 78
1.2.1.2.1 Les souches BL21 (DE3) et Rosetta™ 2 78
1.2.1.2.2 La souche M15 [pRP4] 79
1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens* 79
1.3 Les souches fongiques 79
1.3.1 *Botrytis cinerea* 79

1.3.2 *Phytophthora parasitica* 79

1.4 Les plasmides 80

1.4.1 Le plasmide TA pCR™8 80
1.4.2 Les plasmides d'expression des protéines recombinantes 81
1.4.2.1 Le plasmide pET28b 81
1.4.2.2 Les constructions plasmidiques utilisées comme témoins positifs dans ce travail 83
1.4.2.2.1 Le plasmide pET3a-CyHCT 83
1.4.2.2.2 Le pGEX-NtHCT 84
1.4.2.3 Le pQE30-4CL 84
1.4.2.4 Le plasmide binaire pGWB2-GW 85

2 Les outils de bioinformatique 87

3 Les outils de microbiologie 87

3.1 Mise en place des conditions stériles 87

3.2 Les conditions de culture des bactéries 88

3.2.1 Les milieux de culture 88
3.2.2 Les antibiotiques utilisés 89

3.3 Les conditions de culture des champignons 89

4 Les outils de biologie moléculaire 90

4.1 L'extraction et la détection des acides nucléiques 90

4.1.1 Extraction des ARN 90
4.1.2 Extraction de l'ADN génomique 90
4.1.3 Extraction d'ADN plasmidique à partir de bactéries transformées 90
4.1.4 Migration sur gel d'électrophorèse et révélation des acides nucléiques 91
4.1.5 Extraction d'un gène à partir d'un gel d'électrophorèse 91

4.2 La quantification des acides nucléiques et des protéines 91

4.3 La synthèse des ADNc ou transcription inverse 92

4.4 La RT-PCR 92

4.5 L'amplification des gènes d'intérêt par PCR et la PCR en temps réel (qPCR) 92

4.5.1 Les applications ciblées 92
4.5.2 L'élaboration des amorces de PCR et de qPCR 93
4.5.2.1 Les amorces utilisées pour le clonage des gènes candidats dans le plasmide d'expression 93
4.5.2.2 Les amorces utilisées pour l'isolement des séquences d'HCT d'autres espèces 95
4.5.2.3 Amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire des tabacs transgéniques 96
4.5.2.4 Les amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes candidats chez l'ipomée 97
4.5.2.4.1 Les amorces spécifiques des gènes de référence 97
4.5.2.4.2 Les amorces spécifiques des gènes candidats 97
4.5.2.4.3 Les amorces spécifiques des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes chez l'ipomée 99
4.5.2.5 Les amorces utilisées pour l'expression des gènes d'intérêt dans les tabacs transgéniques 99

4.5.3 Les conditions de PCR 100
4.5.4 Les conditions de qPCR 101
4.5.5 La digestion par des enzymes de restriction 102

4.6 Les techniques de clonage 102

4.6.1 Clonage dans le plasmide pCR8 via le système « TOPO TA cloning » 102
4.6.2 Clonage des gènes d'intérêt dans le plasmide pET28b 103
4.6.2.1 Digestion enzymatique et déphosphorylation du plasmide pET28b 103
4.6.2.2 Reconcentration du plasmide digéré 104
4.6.2.3 Ligation des gènes d'intérêt dans le pET28b par la T4 DNA ligase 104
4.6.2.4 Clonage dans le plasmide pGWB2-GW 105

4.7 Le séquençage du gène 106

4.8 La transformation d'*E. coli* 106

4.8.1 Transformation par choc électrique 106
4.8.1.1 Obtention d'*E. coli* électro-compétentes 106
4.8.1.2 Le choc électrique ou électroporation 106
4.8.2 Transformation par choc thermique 107
4.8.2.1 Obtention d'*E. coli* chimio-compétentes 107
4.8.2.2 Le choc thermique 107

4.9 La transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* par choc thermique 107

4.9.1 Préparation des Agrobactéries chimiocompétentes 107
4.9.2 Application du choc thermique 108

5 Les outils de production et d'analyse de protéines 108

5.1 Induction de l'expression de la protéine recombinante à l'ITPG chez *E. coli* 108

5.2 Extraction des protéines totales d'*Escherichia coli* 109

5.2.1 Lyse des cellules par broyage à l'azote 109
5.2.2 Lyse des cellules par sonication 109

5.3 Purification de la protéine d'intérêt en conditions natives 109

5.3.1 Les solutions tampon 109
5.3.2 Purification par chromatographie d'échange cationique 110
5.3.2.1 Purification sur colonne spin Ni-NTA 110
5.3.2.2 Purification sur colonne His-Trap HP 111
5.3.2.3 Purification en système Batch 111
5.3.3 Dessalage et concentration 111
5.3.3.1 Les colonnes Sephadex™ G-25 111
5.3.3.2 Les colonnes Centricon de 10 kDa 112

5.4 Séparation des protéines totales par SDS-PAGE 112

5.5 Détection immunologique par Western Blot des protéines His-taggées 113

6 Les outils de culture *in vitro* (CIV) 114

6.1 Pratique de la culture *in vitro* 114

6.2 Le milieu de culture de base 114

6.2.1 Le milieu MS (Murashige and Skoog) 114
6.2.2 Les éléments ajoutés au milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) 115

6.3 La mise en germination des graines de tabac 116

6.4 La transformation génétique du tabac *via Agrobacterium tumefaciens* 116

6.4.1 Les milieux de culture 116
6.4.2 Le protocole de transformation 117
6.4.3 Caractérisation des plantes transgéniques 118
6.4.4 Préparation des cultures cellulaires 118
6.4.4.1 Initiation des cals et mise en suspension liquide 118
6.4.4.2 Vérification de la viabilité des cellules végétales et mesure de la densité cellulaire 119
6.4.5 Mesure des paramètres de culture 119

7 Les tests enzymatiques et l'analyse des composés phénoliques 120

7.1 Solution étalon et substrats 120

7.1.1 Les composés en solution stock 120
7.1.2 La synthèse des esters de CoA via la 4CL 121

7.2 Tests d'incubation de l'HCT recombinante avec les substrats 121

7.2.1 Réaction de synthèse des esters d'acide hydroxycinnamique 121
7.2.2 Réaction de synthèse du 3,5-DCQ par l'HCT recombinante 122

7.3 Test d'incubation des extraits foliaires de tabacs transgéniques avec l'acide chlorogénique 122

7.4 Extraction des acides phénoliques 122

7.4.1 Extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle 122
7.4.2 Extraction hydro-éthanolique des tissus végétaux 122

7.5 Méthodes de détection des acides phénoliques 123

7.5.1 Détection à l'HPLC 123
7.5.2 Identification en UPLC-MS 123

8 Test d'infection sur disques foliaires de tabac 124

8.1 Test anti-fongique sur les molécules pures 124

8.1.1 Les molécules testées et les témoins 124
8.1.2 Test d'inhibition des molécules sur la croissance fongique 124

8.2 Test d'infection fongique sur feuille détachée 125

8.2.1 Préparation de la suspension de spores de *Botrytis cinerea* 125
8.2.2 Inoculation des feuilles détachées 125

RESULTATS ET DISCUSSION 128

1 Chapitre 1 : Identification des gènes impliqués dans la biosynthèse des dérivés d'acide caféoyl-quinique 128

1.1 Etude phylogénétique 128

1.2 Comparaison par alignement avec des séquences d'acyltransférases de la famille des BAHD et recherche des séquences consensus _____ 133

1.3 Etude comparative en condition d'azote limitant _____ 137

1.3.1 Observation phénotypique des plantes _____ 139

1.3.2 Comparaison des teneurs en acide chlorogénique et en acide 3,5-dicaféoyl-quinique_____ 141

1.3.3 Etude corrélative entre l'expression des gènes d'intérêt et la synthèse des métabolites cibles dans les racines d'ipomée _____ 146

1.4 Clonage des séquences codantes et expression des protéines recombinantes 150

1.5 Conclusion relative à la sélection des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse du 3,5-DCQ_____ 153

2 Chapitre 2 : Etude et caractérisation fonctionnelle in vitro de l'HCT d'ipomée _ 156

2.1 Synthèse des substrats via la 4-coumarate : coenzyme A ligase (4CL) _____ 156

2.1.1 Une alternative économique de production des esters d'acide hydroxycinnamique _____ 156

2.1.2 Modification du protocole de synthèse des esters de CoA _____ 157

2.1.3 Contrôle de la qualité des substrats synthétisés _____ 160

2.1.3.1 Production de caféoyl-CoA _____ 161

2.1.3.2 Production de p-coumaroyl-CoA_____ 162

2.1.3.3 Production de cinnamoyl-CoA _____ 163

2.1.3.4 Production de féruloyl-CoA_____ 163

2.2 Expression hétérologue de l'HCT d'ipomée et de la protéine Ib9 chez *E. coli* 165

2.2.1 Vérification de l'expression de la protéine_____ 165

2.2.2 Caractérisation fonctionnelle de l'HCT d'ipomée _____ 166

2.2.3 Recherche de l'activité de synthèse du 3,5-DCQ par l'HCT d'ipomée_____ 167

2.3 Optimisation des conditions de synthèse des dérivés d'acide caféoyl-quinique 168

2.3.1 Optimisation des techniques de purification et de concentration de la protéine _____ 168

2.3.2 Optimisation des conditions de réaction pour la synthèse de 3,5-DCQ _____ 170

2.3.2.1 Détermination du temps d'incubation _____ 170

2.3.2.2 Effet du pH sur l'activité de l'enzyme _____ 171

2.3.2.3 Effet de la concentration de l'HCT sur la synthèse d'acide chlorogénique _____ 172

2.4 Identification des produits issus de la réaction avec l'HCT d'ipomée _____ 173

2.4.1 Synthèse de l'acide chlorogénique par l'HCT recombinante_____ 173

2.4.2 Synthèse du 3,5-DCQ par l'HCT recombinante à partir d'acide chlorogénique _____ 175

2.5 Autres fonctions de l'HCT d'ipomée_____ 176

2.5.1 Synthèse de caféoyl-shikimate _____ 176

2.5.2 Synthèse de p-coumaroyl-quinate _____ 177

2.5.3 Synthèse de p-coumaroyl-shikimate _____ 178

2.5.4 Synthèse de cinnamoyl-quinate _____ 181

2.5.5 Synthèse de cinnamoyl-shikimate _____ 183

2.6 Conclusion relative à la caractérisation fonctionnelle de l'HCT d'ipomée __ 184

3 Chapitre 3 : étude de l'activité de synthèse du 3,5-DCQ par l'HCT *in planta* ___ 188

3.1 Création de plantes transgéniques par transformation *via Agrobacterium tumefaciens* _____ 188

3.2 Criblage moléculaire des plantes par réaction en chaîne par polymérase (PCR) 191

3.3 Etude corrélative entre l'expression du gène et la production des métabolites cibles 193

3.3.1 Niveaux d'expression relative du transgène dans les plantes transformées _____ 193

3.3.2 Comparaison des teneurs en 3,5-DCQ et en acide chlorogénique sur les plantes transgéniques 195

3.4 Production de 3,5-DCQ à partir d'extraits de feuilles de tabacs transgéniques 196

3.5 Production des métabolites cibles en cultures cellulaires _____ 197

3.5.1 Observations macroscopiques des cultures cellulaires _____ 198

3.5.2 Vérification de l'expression des gènes d'intérêt dans les cultures cellulaires _____ 199

3.5.3 Effet de l'ajout d'acide chlorogénique sur la croissance cellulaire _____ 201

3.5.4 Effet de la carence azotée sur la croissance cellulaire _____ 202

3.5.5 Recherche de la présence des métabolites dans le milieu de culture _____ 203

3.5.6 Production d'acide chlorogénique et de DCQ dans les cellules exprimant les HCT _____ 206

3.5.7 Discussion relative à la production d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ *in planta* et dans les cultures cellulaires _____ 208

3.6 Tests de résistance des plantes transgéniques aux maladies fongiques _____ 210

3.6.1 Etude de l'effet des molécules cibles sur la croissance du mycélium _____ 210

3.6.2 Test d'infection de *Botrytis cinerea* sur feuilles détachées de plantes transgéniques _____ 215

3.6.3 Conclusion relative aux tests anti-fongiques sur les tabacs exprimant les HCT _____ 217

CONCLUSION ET PERSPECTIVES _____ 221

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____ 229

LISTE DES FIGURES _____ 255

LISTE DES TABLEAUX _____ 259

LISTE DES ANNEXES _____ 261

ABREVIATIONS

- **AA :** Acide aminé
- **AIA :** Acide indole 3-acétique
- **AAT :** Anthocyanines acyl transférases
- **AHCT** : Anthocyanine O-hydroxycinnamoyltransferase
- **Amp :** ampicilline
- **ADN :** Acide désoxyribonucléique
- **ADNc :** ADN complémentaire
- **ADNg :** ADN génomique
- **ADN-T** : ADN de transfert
- **ARD:** Agricultural Research for Development
- **ARF:** ADP-ribosylation Factor
- **ARN :** Acide ribonucléique
- **ARNm :** ARN messager
- **Amp :** Ampicilline
- **ATP :** Adénosine Tri Phosphate
- **BAHD** : nomination basée sur la première lettre des 4 premières enzymes biochimiquement caractérisées de la famille des acyl transférases : BEAT, AHCT, HCBT, DAT.
- **BAP** : 6-benzyl aminopurine
- **BCIP:** Sel de 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate *p*-toluidine
- **BET :** Bromure d'éthidium
- **BEAT**: Benzyl alcolhol O-acetyl transferase
- **BEBT:** benzoyl coenzyme A: benzyl alcohol benzoyl transferase
- **C3'H :** *p*-coumaroyl shikimate/quinate 3'-hydroxylase
- **CAD :** Cinnamyl Alcohol Deshydrogenase
- **CaMV :** Cauliflower mosaic virus/ virus de la mosaïque du chou-fleur
- **CAS :** Chemical Abstracts Service
- **CAT :** Chloramphénicol acétyl transférases
- **CCT :** Hydroxycinnamoyl-CoA : caféoyl-*meso*-tartrate hydroxy-cinnamoyl transférase
- **C4H :** Cinnamate-4-hydroxylase
- **Céfo :** Céfotaxime
- **CGA :** Chlorogenic acid ou acide chlorogénique
- **CHI :** Chalcone isomérase
- **CHS :** Chalcone synthase
- **CIP :** Centre International de la Pomme de terre
- **CIV :** Culture *in vitro*
- ***Cm*^{R} :** gène de résistance au chloramphénicol

- **CoA :** Coenzyme A
- **COMT :** 5-hydroxyférulique/caféique-*O*-méthyltransférase
- **CQT :** caféoyl-CoA/quinique caféoyl transférase
- **Ct:** Cycle threshold ou cycles seuils
- **CTA :** Caftaric acid
- **Ctrl :** Contrôle
- **CTT :** hydroxycinnamoyl-CoA:*meso*-tartrate hydroxycinnamoyl transférase
- **dH$_2$O :** eau distillée
- **DAT**: Deacetyl vondoline 4-O-acetyl transferase
- **DCQ :** Dicaffeoylquinic acid ou acide dicaféoyl-quinique
- **Dir:** directe
- **DMSO:** diméthylsulfoxyde
- **dNTP:** deoxynucleotides triphosphates
- **DO :** Densité optique
- **DTT :** Dithiothréitol
- **EDTA**: Ethylene diamine tetra-acetic acid
- **EF1α:** Facteur d'élongation 1α
- **ESI:** Electronebulization Source of Ionisation
- **FAO:** Food and Agricultural Organization of the United Nations
- **FD:** Fast Digest
- **GST:** Glutathion-S-transferase
- **Gw :** Gateway®
- **HCT :** hydroxycinnamoyl shikimate/quinate acyl transférases
- **HCBT:** N-hydroxy cinnamoyl benzoyl transferase
- **HQT:** hydroxycinnamoyl shikimate/quinate acyl transférases
- **HiFi :** High fidelity
- **HPLC :** High Performance Liquid Chromatography/ chromatographie liquide à haute performance
- ***hpt* :** gène codant pour l'hygromycine phospho transférase
- **HTT :** hydroxycinnamoyl-CoA : tartrate hydroxycinnamoyl transférase
- **4-CL** : 4-coumarate : coenzyme A ligase ou 4-hydroxycinnamoyl CoA ligase
- **Ib :** *Ipomoea batatas*
- **ID :** Identité
- **INCI:** International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
- **IPTG** : Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
- **IUPAC :** International Union of Pure and Applied Chemistry (Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée)
- **Kana :** Kanamycine
- **LB (1) :** Lysogeny Broth
- **LB (2) :** Left Border

- **LC-MS** : Chromatographie Liquide couplée à une spectrométrie de masse
- **LDL :** Low-density lipoprotein
- **MCS :** Multiple cloning site
- **MS** : Murashige et Skoog
- **MS :** Mass spectrometry ou spectrométrie de masse
- **m/v :** masse/volume
- **NAA** : 1-naphtalene acetic acid
- **NBT** : Nitro-blue tetrazolium chloride
- **NCBI** : National Center for Bioinformatic Information
- **Ni-NTA** : Ni^{2+}-nitrilotriacetic acid
- **NO :** Nitric oxyde
- **Npt :** gène codant pour la néomycine phospho transférase II
- **Nt :** *Nicotiana tabacum*
- **OGM :** Organisme Génétiquement Modifié
- **OmpT :** Omptin protéase
- **OMT** : O-methyltransferase
- **Ori :** Origine de réplication
- **p/v :** poids/volume
- **PAL :** Phenylalanine ammonia lyase
- **PAT SA :** Plant Advanced Technologies SA
- **PBS :** Phosphate Buffer Sodium ou tampon phosphate sodium
- **PDA :** Photo Diode Array
- **PDA :** Potato Dextrose Agar
- **PDB :** Potato Dextrose Broth
- **P35S :** Promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
- **Pb :** Paires de bases
- **PLD :** Phospholipase D1
- **Pnos :** Promoteur de la nopaline synthase
- **PPO :** Polyphenol oxydase
- **PT7 :** Promoteur T7
- **pTi :** Plasmid Tumor inducing
- **PVDF :** polyvinylidene fluoride
- **qPCR :** PCR en temps réel ou PCR quantitative
- **RAS :** Rosmarinic acid Synthase
- **RB :** Right Border
- **RBS :** Ribosomal binding site
- **Rev :** Reverse
- **Rif :** Rifampicine
- **RMN :** Résonance Magnétique Nucléaire
- **ROS :** Reactive Oxygen Species/espèces réactives à l'oxygène

- **RPL :** L ribosomal protein
- **RQ :** Relative quantity
- **RT-PCR** : Reverse transcriptase polymerase chain reaction
- **SBP :** Site Binding Pocket ou site de liaison
- **SCP :** Serine Carboxy Peptidase
- **SDS :** Sodium dodecyl sulphate
- **SDS-PAGE** : Sodium dodecyl sulphate poly acrylamide gel electrophoresis
- **STS :** Stilben synthase
- **Spec :** Spectinomycine
- **Strep :** Streptomycine
- **TAE :** Tris acetate EDTA
- **TAL :** Tyrosine ammonia-lyase
- ***Taq :*** *Thermophilus aquaticus*
- **TCQ :** Tricaffeoylquinic acid ou acide tricaféoylquinique
- **TE :** Tris EDTA
- **Tm :** Melting temperature/ température de fusion
- **Tnos :** Terminateur de la nopaline synthase
- **UA :** Unité arbitraire
- **UGCT :** caféoyl glucoside : UDP glucose : *t*-cinnamate glucosyl transferase
- **UCGQT :** Hydroxycinnamoyl UDP-glucose : quinate hydroxycinnamoyl transférase
- **UPLC :** Ultra Performance Liquid Chromatography
- **UV** : Ultra-violet
- **V :** volume
- **Var :** variété
- **VIGS :** Virus-induced gene silencing
- **VIH :** Virus de l'immunodéficience Humaine
- **Vir :** gènes de virulence
- **V8 :** Vegetable 8
- **WT :** Wild-Type ou sauvage
- **YEB :** Yeast extract beef extract

ESPECES CITEES

Arabidopsis thaliana (arabette des dames)
Arachis glabrata
Artemisia annua (armoise annuelle)
Avena sativa (avoine)
Catharanthus roseus (pervenche de Madagascar)
Chlorella sorokiniana
Chrysanthemum morifolium (chrysanthème)
Chrysanthemum coronarium (chrysanthème)
Clarkia breweri
Coffea arabica (café Arabica)
Coffea canephora (café Robusta)
Coleus blumei ; syn. Solenostemon scutellarioides (plectranthe fausse-scutellaire)
Coptis japonica
Cichorium intybus (endive)
Cynara cardunculus (artichaut)
Cynara scolymus (artichaut)
Dahlia variabilis
Dianthus caryophyllus (œillet commun)
Dipsacus asper (cardère sauvage)
Echinacea angustifolia (rudbeckie pourpre, échinacée)
Echinacea purpurea (rudbeckie pourpre, échinacée)
Echinacea pallida (échinacée)
Equisetum arvense (prêle des champs)
Erythroxylum coca (coca)
Filipendula ulmaria (reine des prés)
Gentiana trifolia (gentiane)
Ginkgo biloba
Glycyrrhiza glabra (réglisse)
Gossypium arboreum (cotonnier en arbre)
Helianthus tuberosus (artichaut de Jérusalem)
Hordeum vulgare (orge commune)
Ipomoea batatas (patate douce)
Kalimeris indica
Laggera alata
Lavandula augustifolia (lavande)
Lithospermum erythrorhizon (grémil des teinturiers)
Lonicera japonica (chèvrefeuille du Japon)
Lonicera maackii (chèvrefeuille de Maack)
Matricaria chamomilla (camomille)

Espèces citées

Mikania micrantha (liane américaine)
Nicotiana attenuata
Nicotiana benthamiana (tabac)
Nicotiana sylvestris (tabac sylvestre)
Nicotiana tabacum (tabac)
Oryza sativa (riz)
Panicum vergatum (panic érigé)
Papaver somniferum (pavot somnifère)
Pastinaca sativa (panais)
Petunia hybrida (pétunia)
Phoenix dactylifera (datte)
Pinus radiata (Pin de Monterey ou Pin insigne)
Platycoton grandifolium (platycodon)
Populus nigra (peuplier noir)
Rosa Hybrida (rose)
Rauwolfia serpentina
Salix alba (saule blanc)
Solanum lycopersicum (tomate)
Solanum melongena (aubergine)
Solanum pennelli
Solanum tuberosum (pomme de terre)
Sorghum bicolor (sorgo commun)
Taxus brevifolia (if de l'Ouest)
Theobroma cacao (cacaoyer)
Trifolium pratense (trèfle violet)
Valeriana officinalis (valériane officinale)
Vitis vinifera (vigne)
Xanthium
Zea mays (maïs)

Espèces bactériennes
Agrobacterium tumefaciens
Erwinia chrysanthemi
Escherichia coli
Pseudomonas syringae

Espèces fongiques

Blumeria graminis
Botrytis cinerea

Espèces citées

Fusarium solani
Gibberella zeae
Phytophthora capsicii
Phytophthora parasitica
Plasmopora viticola
Rhizopus stolonifera

Parasites

Plasmodium falciparum

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Au cours de l'évolution, les végétaux ont développé des stratégies diverses et variées pour s'adapter à des conditions environnementales souvent hostiles. Parmi les processus adaptatifs on trouve un métabolisme spécialisé très actif permettant la synthèse d'un arsenal de molécules. Certaines de ces molécules sont produites de manière constitutive tandis que la synthèse d'autres peut être induite en réponse à divers types de stress. La diversité de ces molécules est quasiment illimitée. En effet, plusieurs milliers de molécules différentes sont produites dans les plantes et chaque plante dispose d'un profil métabolique différent. On estime qu'il existe environ 400 000 espèces végétales (www.theplantlist.org) et seules 10 000 à 15 000 ont fait l'objet d'études phytochimiques (Roth et Lindorf, 2013). Le réservoir de ces molécules est donc loin d'être épuisé à ce jour.

Ces molécules actives sont essentielles à la plante mais peuvent également être utilisées par l'Homme pour diverses applications. Les propriétés de ces molécules de défense suscitent, par exemple, un intérêt tout particulier en agronomie dans le contexte du plan Ecophyto 2 publié en octobre 2015 qui stipule une réduction de produits phytosanitaires de 25% d'ici à 2020. Dans ce cadre, les substances naturelles extraites à partir de plantes peuvent être utilisées comme une solution de biocontrôle pour lutter contre des ravageurs, des maladies cryptogamiques ou encore contre des adventices.

Produit	Utilisation	Espèce végétale d'origine	Coût ($/kg)
Artémisinine	anti-malarial	*Artemisia annua*	400
Berbérine	traitement des maladies intestinales	*Coptis japonica*	3250
Morphine	analgésique	*Papaver somniferum*	340 000
Shikonine	anti-bactérien	*Lithospermum erythorhizon*	4500
Taxol	anti-cancer	*Taxus brevifolia*	600 000
Vincristine	anti-leucémique	*Catharanthus roseus*	2 000 000
Vinblastine	anti-leucémique	*Catharanthus roseus*	1 000 000

Tableau 1: Exemples de produits pharmaceutiques d'origine végétale à valeur commerciale (Miralpeix et al., 2013).

Ces molécules sont aussi largement exploitées pour leurs propriétés thérapeutiques. La première molécule végétale active responsable d'un effet pharmacologique a été découverte il y a environ 200 ans. Il s'agit de la morphine, utilisée pour ses propriétés analgésiques. Cette substance, extraite du pavot (*Papaver somniferum*), a été purifiée par le pharmacien allemand

Friedrich Sertürner en 1805. La deuxième molécule fut l'acide salicylique, proche parent de l'« aspirine », qui fut purifiée à partir du saule en 1839 (Rischer *et al*., 2013). Depuis ces travaux pionniers, les métabolites végétaux ont pris une part importante des médicaments mis sur le marché (Tableau 1).

Près de 50% des substances actives contre le cancer ou les infections microbiennes sont produites par les plantes. Par exemple, l'artémisinine, extraite d'*Artemisia annua*, est utilisée comme médicament anti-paludique. Le taxol, produit par l'If est un anti-cancer. Un autre composé, le resvératrol impliqué dans la défense contre les attaques parasitaires chez la vigne, est un antioxydant utilisé dans le traitement contre certains cancers (Wang *et al*., 2016).

Devant cet engouement croissant pour les molécules d'origine végétale, l'approvisionnement est devenu un challenge d'envergure. La culture des plantes médicinales en champ représente environ 14 000 hectares de surface en France pour une production d'environ 12 000 tonnes/an. Les plantes les plus cultivées à destination des laboratoires pharmaceutiques sont le pavot, le ginkgo biloba, la valériane officinale ou encore la reine des prés (source : www.cpparm.org) qui sont respectivement des sources d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de sesquiterpènes et d'acide salicylique (Seehuber, 1990; Houghton, 1999; Cheng *et al*., 2009; Toiu *et al*., 2011). Certaines de ces molécules sont extraites directement des plantes. Mais ces ressources sont limitées et ce mode de production peut être confronté à divers freins comme la pureté des molécules (métaux lourds, herbicides, radioéléments, problèmes bactériologiques) ou les rendements de production faibles liés à des fluctuations de récolte (Terryn *et al*., 2006). Pour pallier ces limites, une première solution vise à synthétiser ces molécules par voie chimique. Cette approche s'avère être souvent compliquée à mettre en œuvre en raison de la grande complexité et diversité des structures moléculaires. Une autre solution consiste à produire ces molécules en utilisant des approches de génie métabolique. Cette stratégie consiste à transférer les gènes codant les enzymes d'une voie de biosynthèse dans le génome d'un organisme hétérologue comme les micro-organismes ou une autre espèce végétale. Cette approche a d'ores et déjà été mise en œuvre pour la production de morphine (Minami, 2013). Ces approches peuvent être combinées pour améliorer la production et l'adapter à l'échelle industrielle. C'est le cas par exemple pour la synthèse de l'artémisine. Des précurseurs sont d'abord produits par voie chimique puis sont biotransformés en artémisine dans des levures génétiquement modifiées (Lévesque et Seeberger, 2012; Zeng *et al*., 2012).

L'entreprise Plant Advanced Technologies (PAT) est une société de biotechnologies végétales qui produit des actifs végétaux rares et dotés de propriétés d'intérêt à destination des marchés cosmétiques, pharmaceutiques et agrochimiques. Le cœur d'activité de PAT est fondé sur un brevet déposé par l'Institut National Polytechnique de Lorraine-INRA (INPL) en 1999. Ce brevet décrit la technologie « Plantes à Traire® » qui repose sur l'extraction de molécules de plantes par exsudation racinaire. Pour compléter le panel de techniques mises en œuvre et augmenter la diversité des produits proposés, l'entreprise développe depuis 2012 un nouvel axe de recherche centré sur l'ingénierie métabolique. L'objectif de ce nouvel axe de recherche consiste à produire ou à modifier par voie enzymatique, des molécules présentes naturellement dans les plantes.

Mon travail de thèse s'inscrit dans la mise en œuvre d'approches d'ingénierie métabolique, pour la production de molécules dérivées d'acide caféoyl-quinique. La première partie de ce manuscrit dressera un état de l'art au travers d'une synthèse bibliographique centrée sur les métabolites secondaires et plus particulièrement sur les dérivés d'acide caféoyl-quinique, molécules qui ont été au centre de mes activités de recherche durant ma thèse. Après une présentation générale de ces molécules, je ferai un état des lieux des connaissances actuelles sur leur synthèse. Je me pencherai notamment sur une famille d'enzymes impliquées dans la synthèse de ce type de molécules. Par la suite, je repositionnerai les objectifs de mon travail de thèse qui s'inscrivent dans le cadre stratégique de développement d'applications industrielles de PAT.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, je présenterai les résultats obtenus concernant l'identification et la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la synthèse de dérivés d'acide caféoyl-quinique.

Enfin, je terminerai en explicitant certaines perspectives qui découleront de ce travail.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les métabolites secondaires : une grande diversité chez les végétaux

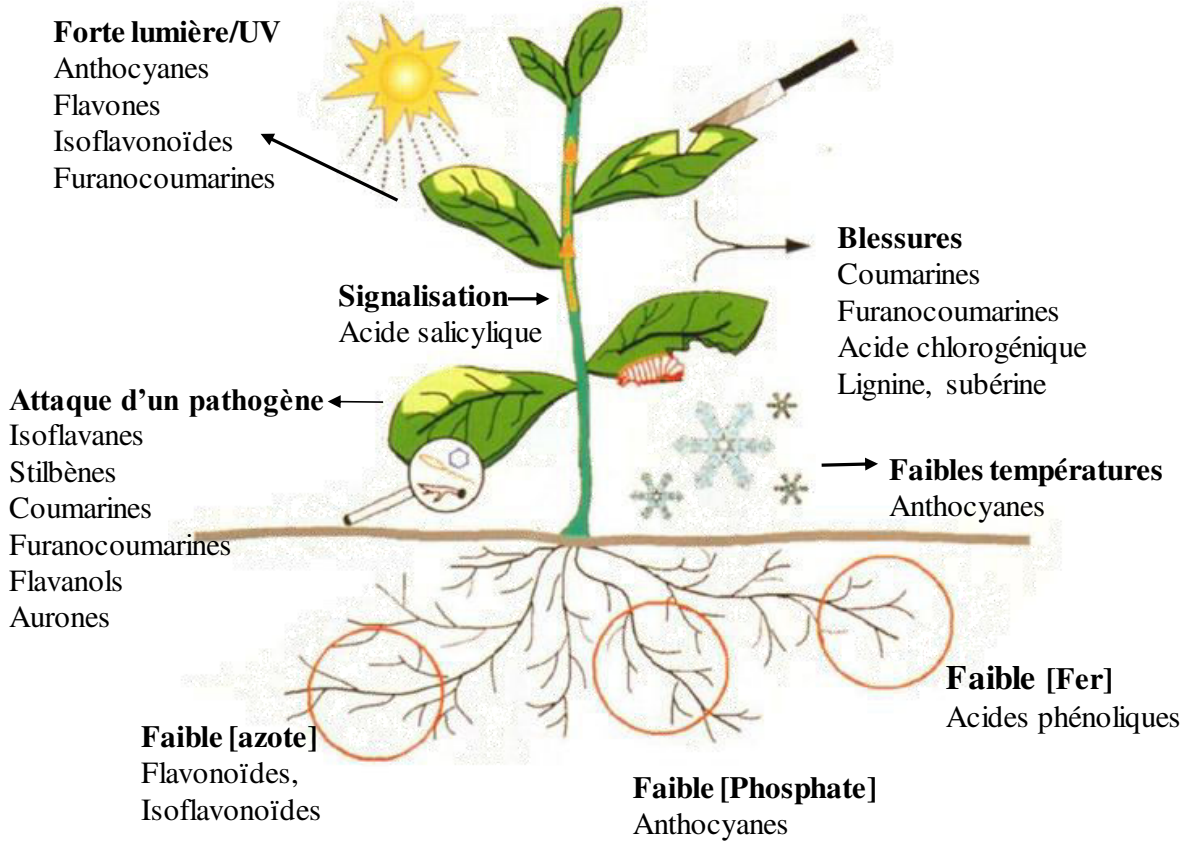


Figure 1 : Exemples et localisation de quelques phénylpropanoïdes induits par un stress. D'après Dixon et Paiva, 1995.

Les métabolites secondaires, encore appelés métabolites spécialisés, représentent des milliers de molécules propres à chaque plante et produites en réponse à des conditions environnementales diverses et variées (Figure 1). Souvent, ils sont produits ponctuellement et leur synthèse peut être induite par un stress comme une blessure ou une attaque par un pathogène (La Camera *et al*., 2004). De nombreux travaux indiquent que ces molécules agissent comme des agents antibiotiques, anti-fongiques et anti-viraux (Chen *et al*., 2009; Vaishnav et Demain, 2011; Sánchez-Maldonado *et al*., 2016). Ils jouent des rôles de défense contre les insectes et les herbivores (phytoalexines) et sont impliqués dans des interactions avec d'autres plantes (allélopathie) (Cipollini *et al*., 2008a). Ils permettent également de préserver les plantes contre des stress biotiques et peuvent, par exemple, absorber les rayonnements UV, protégeant ainsi les plantes des dommages causés par la lumière du soleil (Croteau *et al*, 2000).

Les métabolites secondaires sont classiquement subdivisés en trois classes de molécules : les terpénoïdes, les alcaloïdes et les phénylpropanoïdes (Dixon et Paiva, 1995). Les terpénoïdes, ou isoprénoïdes, dérivent d'entités isoprènes à cinq carbones plus ou moins assemblés dont on distingue les formes simples comme les hémiterpènes (C5), les monoterpènes (C10) et autres formes plus polymérisées (di-, tri-terpènes, etc…). Les alcaloïdes sont des molécules possédant un squelette hétérocyclique azoté. Les deux groupes les plus représentés sont les alcaloïdes isoquinoléiques (plus de 1500) et indoliques (plus de 700). Enfin, les phénylpropanoïdes constituent une famille majeure de molécules dérivant du métabolisme de l'acide *p*-coumarique. Dans la suite de ce manuscrit, je me restreindrai à cette dernière classe de molécules qui ont été au cœur de mes travaux.

2 Les phénylpropanoïdes et dérivés

2.1 Structure générale des composés phénoliques

Le nom « phénylpropanoïde » tient son origine d'un groupement phénol aromatique (phényl) lié à une chaîne latérale de trois carbones (propane) (Figure 2).

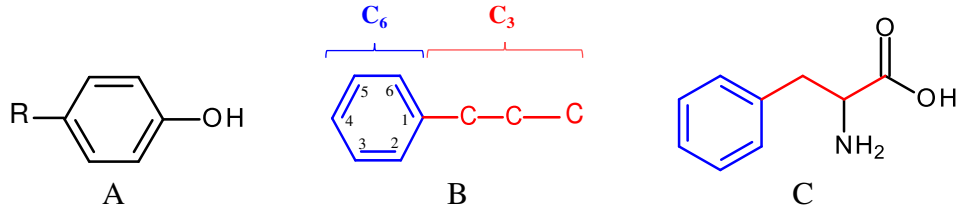


Figure 2 : Structure de base d'un groupement phénol aromatique (A) et structure C6-C3 (B) ; structure de la phénylalanine (C). Le cycle benzénique (C6) est représenté en bleu et la chaîne latérale à 3 carbones (C3) en rouge.

Cette structure C_6-C_3, dérive directement de deux acides aminés aromatiques : la L-phénylalanine ou la L-tyrosine. La structure de base d'un phénol se définit par la présence d'un ou plusieurs groupements hydroxyle (-OH) sur un noyau benzénique (C6). On distingue ainsi les monophénols (un seul groupement phénol), les diphénols (deux groupements phénol) ou plus généralement les polyphénols (ensemble de plusieurs groupements phénol) (Macheix *et al.*, 2005 ; Rischer *et al.*, 2013). Cette fonctionnalisation n'est pas restreinte au groupement hydroxyle et d'autres dérivés sont décrits dans la littérature présentant des oxydations, des glycosylations, des estérifications ou encore des méthylations.

2.2 Les polyphénols disposent de propriétés antioxydantes reconnues

Les polyphénols suscitent une attention particulière car ils permettent de se prémunir contre le stress oxydatif à l'origine de nombreuses pathologies comme le cancer, le vieillissement des

cellules et les problèmes cardiovasculaires (Yoshimoto *et al.*, 2002). Ces propriétés antioxydantes incluent la capacité à piéger les radicaux libres, la chélation des métaux, l'inhibition de la peroxydation des lipides et la production d'oxyde nitrique (NO) (Pisoschi et Pop, 2015).

Ces propriétés antioxydantes sont dépendantes de la structure des molécules, et plus particulièrement du nombre et de la position des groupements hydroxyles portés par les groupements aromatiques (Balasundram *et al.*, 2006). Il en découle que les monophénols ont des propriétés antioxydantes moins puissantes que les polyphénols (Hsieh *et al.*, 2005). La présence de ces groupements n'est cependant pas la seule responsable de ces propriétés. Ainsi, les acides hydroxycinnamiques ont une activité antioxydante plus forte que les acides hydroxybenzoïques, liée à la présence d'un groupement CH=CH-COOH (Rice-Evans *et al.*, 1996). Il a également été rapporté que la structure catéchol des acides phénoliques et des flavonoïdes est essentielle au piégeage des radicaux libres et aux effets de chélation des métaux. Les dérivés d'acide caféoyl-quinique qui ont une structure catéchol sous forme libre sont donc particulièrement intéressants de ce point de vue (Kim *et al.*, 2011). Toutes ces molécules sont synthétisées à partir d'une voie générale commune et sont divisées en plusieurs classes que nous allons commenter par la suite (cf δ 2.4).

2.3 La voie de biosynthèse est régie par une cascade de réactions enzymatiques

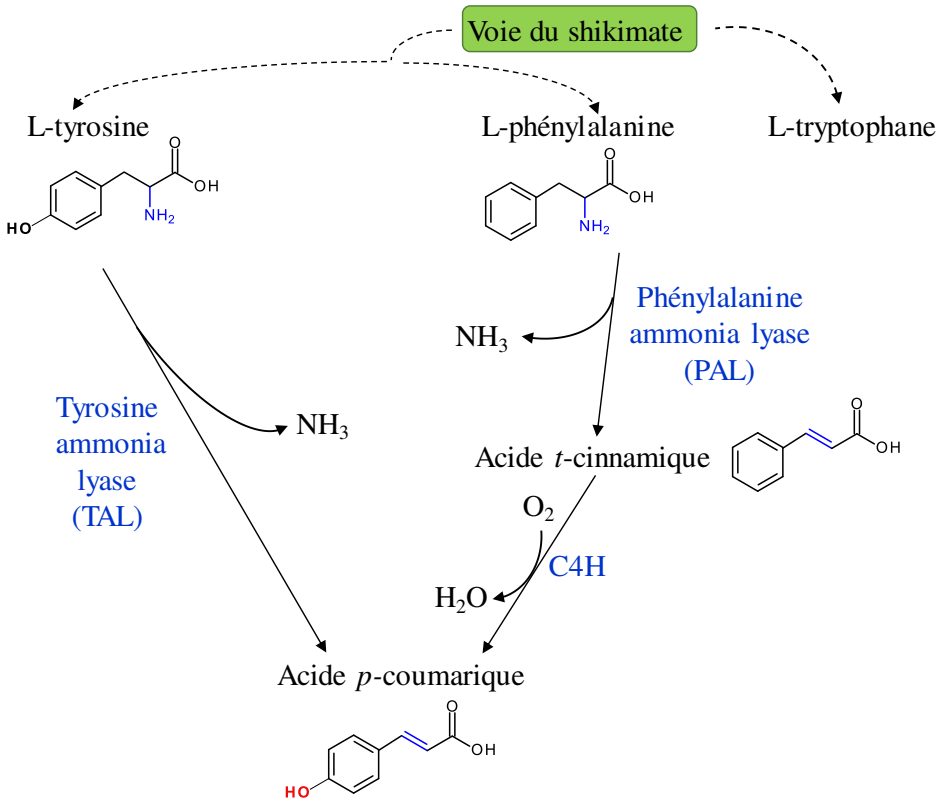


Figure 3 : Représentation schématique des deux voies alternatives de biosynthèse de l'acide p-coumarique. Figure inspirée de Rosler et al., 1997 et Tzin et Galili, 2010.

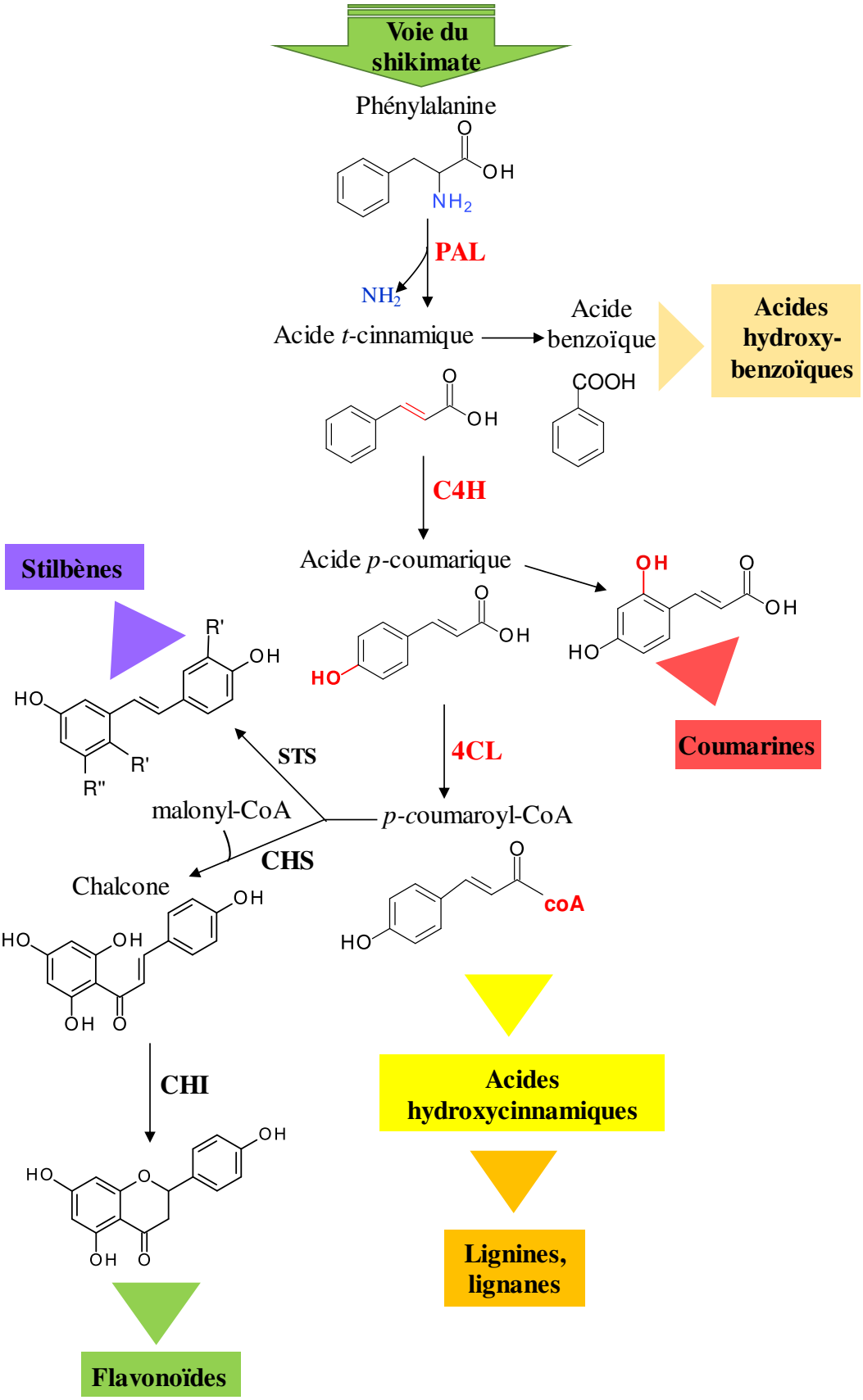


Figure 4 : Représentation simplifiée des différentes voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Figure adaptée de Vogt, 2010. PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase ;

C4H : Cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate : coenzyme A ligase ; CHS : Chalcone synthase ; STS : Stilbène synthase ; CHI : Chacone isomérase. R : radical.

La diversité des phénylpropanoïdes est directement liée à plusieurs voies de biosynthèse qui permettent la conversion enzymatique de deux acides aminés par des décarboxylations, des oxydations/réductions, des hydroxylations, des glycosylations, des méthylations ou encore des acylations (Pichersky et Gang, 2000). Ces acides aminés précurseurs, issus de la voie du shikimate, sont soit de la phénylalanine, qui est majoritaire chez les plantes, soit de la tyrosine (Figure 3).

Dans le premier cas, la première enzyme mise en jeu dans cette voie est la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). La PAL appartient à la famille des ammonia-lyases, enzymes permettant la rupture de liaisons carbone-azote. Ainsi, elle catalyse la désamination de la phénylalanine pour former l'acide *trans*-cinnamique. Plusieurs études ont montré qu'au sein d'une espèce, la PAL peut être codée par plusieurs gènes, le nombre de gènes dépendant de l'espèce considérée (Cochrane *et al*., 2004 ; Reichert *et al*., 2009). L'exemple le plus remarquable est la famille multigénique identifiée chez la tomate, au sein de laquelle une vingtaine de gènes sont identifiés (Chang *et al*., 2008). La seconde étape de la synthèse de ces molécules consiste en la conversion de l'acide *trans*-cinnamique en acide *para*-coumarique, par une réaction d'oxydation réalisée par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H). Cette enzyme appartient à la superfamille des cytochromes P450 (Koukol et Conn, 1961; Teutsch *et al*., 1993) (Figure 3).

Dans le second cas, c'est la tyrosine qui subit une désamination catalysée par la tyrosine ammonia-lyase (TAL) et qui génère directement le *p*-coumarate. Si la PAL est majoritairement impliquée dans la synthèse des polyphénols chez les végétaux, on retrouve tout de même la TAL chez certaines familles de plantes, et en particulier chez les monocotylédones (Neish, 1961).

Lors de la troisième étape de la synthèse des phénylpropanoïdes, l'acide *p*-coumarique est transformé en 4-coumaroyl-CoA par la 4-coumarate : CoA ligase (4CL) (Figure 4). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe trois 4CL différentes codées par trois gènes différents. Il a été mis en évidence que les trois isoenzymes ont des fonctions différentes. La première isoenzyme participe à la synthèse des flavonoïdes tandis que les deux autres sont impliquées dans la synthèse de la lignine et d'autres composés phénoliques. Une étude phylogénétique de ces gènes chez les angiospermes révèle une classification en deux groupes majeurs distincts en fonction des propriétés enzymatiques et des conditions d'expression (Ehlting *et al*., 1999).

Le *p*-coumaroyl-CoA est le point d'embranchement de plusieurs voies de biosynthèse car c'est le précurseur des différents dérivés phénylpropanoïques à savoir les flavonoïdes, les stilbènes, les coumarines, les acides hydroxycinnamiques et les lignines (Figure 4). La diversité de ces molécules résulte d'une série de réactions principalement assurées par des hydroxylases, des ligases, des transférases et notamment des méthyltransférases (Vogt, 2010).

2.4 Les principales classes de phénylpropanoïdes

	Squelette carboné	Classe de composé
Formes simples	C_6	Phénols simples
	C_6-C_1	Acides hydroxybenzoïques
	C_6-C_2	Acétophénones, phénylacétates
	C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques, phénylpropènes, coumarines, chromones
	C_6-C_4	Naphtoquinones
	C_6-C_1-C_6	Xanthones
	C_6-C_2-C_6	Stilbènes, anthraquinones
	C_6-C_3-C_6	Flavonoïdes
Formes complexes	$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanes
	$(C_6)_n$	Catéchols mélanines
	$(C_6$-$C_1)_n$: Glucose	Tanins hydrolysables
	$(C_6$-$C_3)_n$	Lignines
	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoïdes
	$(C_6$-C_3-$C_6)_n$	Tanins condensés (polymères de catéchines, proanthocyanidines)

Tableau 2 : Classification des phénylpropanoïdes.

Une classification basée sur la structure chimique distingue diverses molécules allant des formes simples en C_6 (qui n'existent pas naturellement chez les végétaux), à des structures de type flavonoïdes en C_{15}, jusqu'à des formes plus complexes résultant de la condensation de plusieurs molécules (Bravo, 1998) (Tableau 2). Je présente, dans la section suivante, les principales classes les plus fréquemment rencontrées.

2.4.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules à 15 carbones arrangés en une configuration C_6-C_3-C_6 d'où découlent plus de 4500 molécules. La structure générale consiste en deux noyaux aromatiques (A et B) reliés par un hétérocycle central (C) (Figure 5). Des modifications aussi bien au niveau de l'hétérocycle central qu'autour de la structure globale génèrent plusieurs classes de flavonoïdes (Figure 5). Sur cette structure de base des flavonoïdes peuvent se greffer un certain nombre de groupements plus complexes comme des groupements glucidiques ou encore des groupements isoprènes (Kumar et Pandey, 2013).

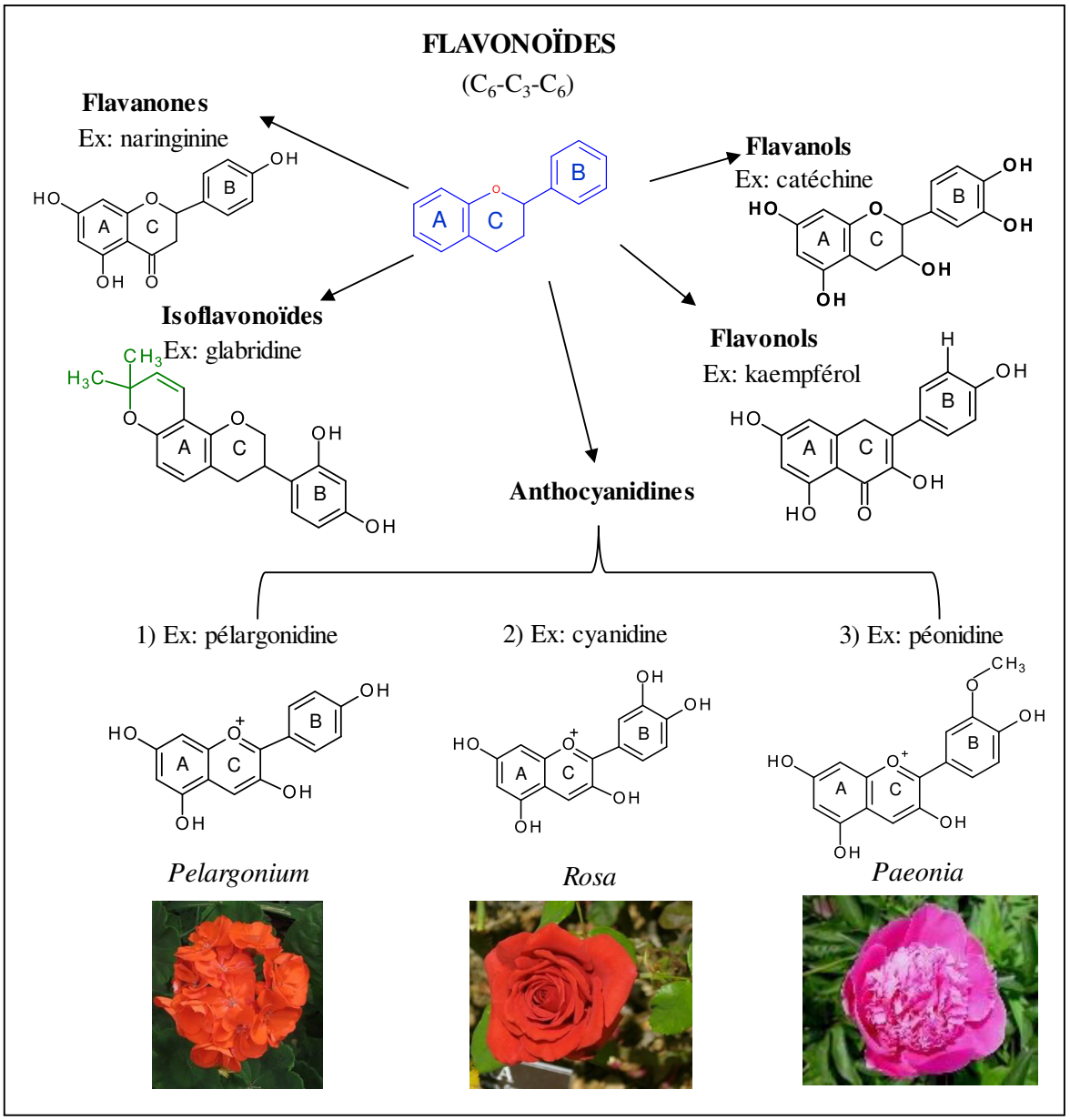


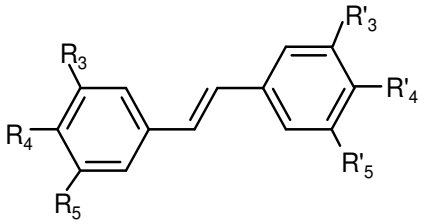
Figure 5 : Squelette moléculaire des flavonoïdes et classification générale des dérivés. Figure inspirée de Manach et al, 2004. Source de la photo : https://gobotany.newenglandwild.org. Le groupement prényl est surligné en vert.

Ces composés ont été décrits comme jouant des rôles très divers au sein des plantes. Les anthocyanidines comme la péonidine, la pélargonine et la cyanidine, sont responsables de la pigmentation des fleurs chez la pivoine, le pélargonium et la rose respectivement. Les flavonols comme le kaempférol protègent les plantes contre les rayonnements UV-B. Des flavones comme l'apigénine sont importantes dans des interactions symbiotiques (Benedito et Modolo, 2014).

En dehors de leur rôle physiologique, il a été montré dans de nombreux travaux que les flavonoïdes disposaient de propriétés physico-chimiques leur conférant un intérêt thérapeutique. Par exemple, le kaempférol dispose de propriétés prometteuses pour le traitement du cancer pancréatique (Zhang *et al*., 2008). D'autres travaux indiquent que plus la

molécule est hydroxylée et plus les propriétés antioxydantes sont importantes (Kongpichitchoke *et al*., 2015). La baïcaléine représente ainsi un exemple de molécule à fort potentiel pour l'industrie cosmétique (Li *et al*., 2010). Enfin d'autres molécules, les flavonoïdes prénylés sont dotées d'activités anti-microbiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires. Leurs propriétés sont liées au pouvoir lipophile du groupement prényl (Figure 5) qui leur confère une forte affinité pour les membranes cellulaires ou des protéines cibles comme par exemple le récepteur estrogène humain (Simons *et al*., 2012; Yang *et al*., 2015). La glabridine qui est extraite des racines de réglisse, est qualifiée de phytoestrogène et est utilisée notamment dans les traitements pour les cancers de type hormonaux et l'ostéoporose. Ce composé est également répertorié dans la nomenclature internationale des ingrédients pour la cosmétique (INCI), décrit comme agent d'anti-vieillissement de la peau (Simmler *et al*., 2013).

2.4.2 Les stilbènes



$R_3 = R_4 = R_5 = R'_4 = H$, $R'_3 = R'_5 = OH$	Pinosylvine
$R_3 = R_5 = R'_3 = R'_4 = OH$, $R_4 = R'_5 = H$	Picéatannol
$R_3 = R_5 = R'_4 = OH$, $R_4 = R'_3 = R'_5 = H$	*trans*-resvératrol
$R_3 = R_5 = OCH_3$, $R'_4 = OH$, $R_4 = R'_3 = R'_5 = H$	*trans*-ptérostilbène
$R'_4 = OCH_3$, $R_3 = R_5 = OH$, $R_4 = R'_3 = R'_5 = H$	Rhapontigénine
$R_3 = Gluc$, $R_5 = R'_4 = OH$, $R_4 = R'_3 = R'_5 = H$	*trans*-picéide

Figure 6 : Classification des stilbènes et structure moléculaire des composés. R : radical

Relativement proches des flavonoïdes, les stilbènes sont caractérisés par la structure de base C_6-C_2-C_6 (Figure 6). Ces molécules sont issues de la condensation de plusieurs molécules de malonyl-CoA sous l'action de la stilbène synthase (Rupprich et Kindl, 1978).

Chez les plantes, les stilbènes jouent un rôle dans la protection contre les infections fongiques. Par exemple chez la vigne, le stilbène majoritaire est le resvératrol. Cette molécule est impliquée dans la défense contre l'agent pathogène *Plasmopora viticola* responsable du mildiou (Pezet *et al*., 2004). Présent dans la peau du raisin rouge, le resvératrol est une phytoalexine qui contribue à la résistance du pathogène fongique *Botrytis cinerea* responsable de la pourriture grise du fruit. Le resvératrol peut être glycosylé pour donner le picéide et peut se condenser pour donner les viniférines également impliqués dans la résistance contre ses agresseurs (Adrian *et al*., 1997).

Le resvératrol est également connu pour ses effets bénéfiques sur la santé humaine en tant qu'agent anti-cancer, antioxydant et anti-inflammatoire, tout comme son analogue, le picéatannol (Nichols et Katiyar, 2010; Piotrowska *et al*., 2012).

2.4.3 Les coumarines

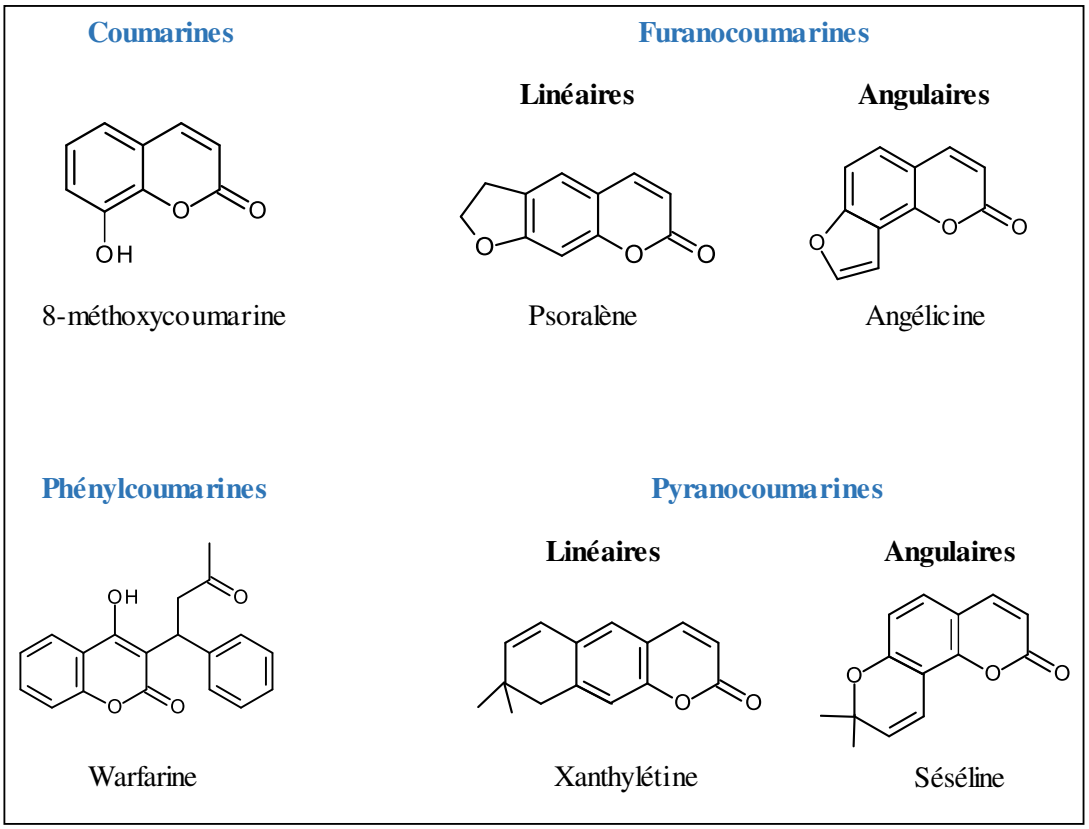


Figure 7 : Classes des coumarines et exemples de structures moléculaires représentatives de chaque classe.

Les coumarines appartiennent à une large famille de métabolites végétaux avec plus de 1500 molécules décrites. Leur structure de base dérive des acides phénoliques : C_6-C_3-C_6. Cette classe comprend les coumarines simples, les furanocoumarines linéaires et angulaires, les pyranocoumarines linéaires et angulaires et les phénylcoumarines (Bourgaud *et al*., 2006) (Figure 7). Chez les plantes, les coumarines jouent un rôle de défense comme lors d'une attaque par un herbivore. Parmi ces molécules, certaines sont photo-sensibilisantes et peuvent être toxiques pour l'homme. Par exemple, le 8-methoxypsoralène, présent dans les feuilles de panais, peut causer une photo-dermatose par simple contact sur la peau après exposition aux radiations UV-A (Caffieri *et al*., 1996). Leurs propriétés physico-chimiques remarquables font que ces molécules disposent d'activités biologiques prometteuses pour des traitements thérapeutiques, comme c'est le cas, par exemple, de la 4-méthoxycoumarine utilisée comme anti-coagulant (Mueller, 2004).

Ces molécules résultent d'une succession de réactions catalysées par des acides *trans*/*cis*-hydroxycinnamiques isomérases, des diméthylallyl transférases, des cytochromes P450 et des *O*-méthyltransférases.

2.4.4 Les lignines

La famille des lignines représente des molécules complexes ayant pour structure commune : $(C_6\text{-}C_3)_2$. Ce sont des polymères d'alcools (*p*-coumarylique, coniférylique et synapylique) dérivés d'esters hydroxycinnamoyl (*p*-coumaroyl-, caféoyl-, féruloyl-, synapoyl-CoA). Ces assemblages constituent les trois unités monolignols de la lignine : guaiacyl (G), syringyl (S) et *p*-hydroxyphényl (H) (Figure 8) (Dixon *et al.*, 2001; Vanholme *et al.*, 2010).

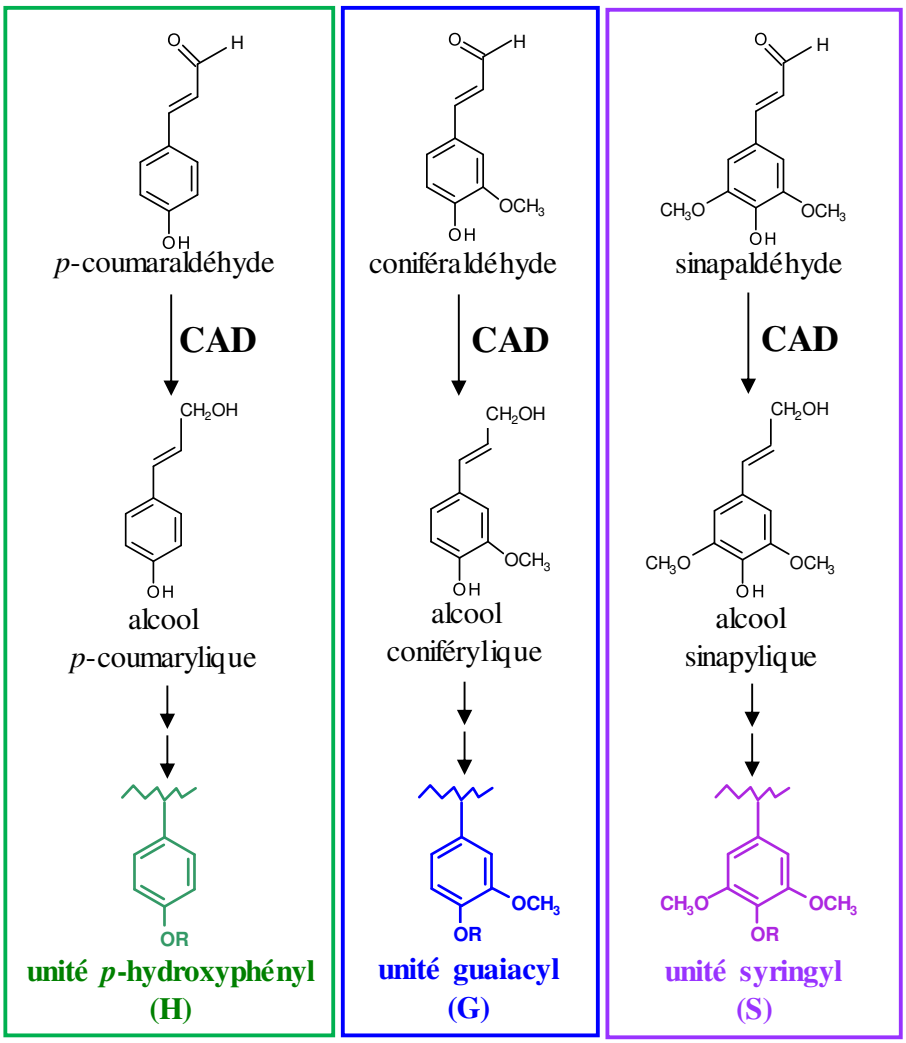


Figure 8 : Structure et formation des trois unités monolignols composant les lignines. CAD : cinnamyl alcohol deshydrogenase.

La lignine, présente dans les parois cellulaires végétales, est le constituant principal du bois avec la cellulose et l'hémicellulose. La composition de la lignine est un élément majeur dans le contrôle développemental de la plante (Osbourn et Lanzotti, 2009). Certains stress peuvent changer la composition et la teneur en lignine comme la sécheresse, les rayonnements UV et la carence en minéraux (Moura *et al.*, 2010). La lignine augmente la rigidité des parois, ce qui constitue un moyen de défense contre les pathogènes (Bhattacharya *et al.*, 2010). Le

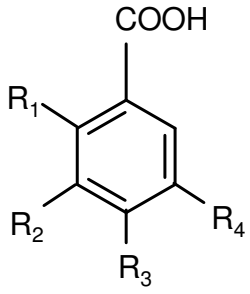
renforcement des parois secondaires est essentiel à divers processus biologiques, comme la déhiscence des anthères et l'éclatement des siliques pour la libération des graines ou encore l'imperméabilité à l'eau (Boerjan *et al*., 2003 ; Zhong *et al*., 2011 ; Yoon *et al*., 2015). La qualité de la lignine conditionne l'accessibilité aux constituants glucidiques dans les parois végétales qui est importante pour la digestion du forage par les ruminants (Baucher *et al*., 1999).

En industrie, la lignine est une ressource naturelle qui sert de matière première pour la fabrication de biocarburants (Kennes *et al*., 2016).

La biosynthèse de la lignine débute par la formation des unités monolignols sous l'action d'une cinnamyl alcool deshydrogénase (CAD), suivi de leur polymérisation par des peroxydases et/ou des laccases (Hirano *et al*., 2012).

2.4.5 Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques dérivent de l'acide benzoïque avec une formule de base de type **C_6-C_1** (Figure 9).



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$	Acide benzoïque (non phénolique)
$R_1 = R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OH$	Acide *p*-hydroxybenzoïque
$R_1 = R_4 = H$, $R_2 = R_3 = OH$	Acide protocatéchique
$R_1 = R_4 = H$, $R_2 = OCH_3$, $R_3 = OH$	Acide vanillique
$R_1 = H$, $R_2 = R_3 = R_4 = OH$	Acide gallique
$R_1 = H$, $R_2 = R_4 = OCH_3$, $R_3 = OH$	Acide syringique
$R_1 = OH$, $R_2 = R_3 = R_4 = H$	Acide salicylique
$R_1 = R_4 = OH$, $R_2 = R_3 = H$	Acide gentisique

Figure 9 : Structure de base des acides hydroxybenzoïques et quelques exemples de formes simples. R : radical

Parmi les formes simples, l'acide gallique (Figure 9) est trouvé en fortes quantités (jusqu'à 2,5% de matière sèche) dans le thé (Cabrera *et al*., 2003). C'est aussi un constituant des tanins présents dans le vin. Cette molécule peut se dimériser pour former l'acide ellagique, extrait de certains arbres comme le chêne et le châtaignier et utilisé en industrie pharmaceutique notamment pour les traitements anti-viraux et anti-microbiens ((Richter *et al*., 1993; Sepulveda *et al*., 2011)

Les acides hydroxybenzoïques se présentent souvent dans les tissus végétaux sous la forme d'esters ou de glucosides comme l'acide salicylique dont le glucoside ou les esters méthyliques ou glucosylés représentent des formes de stockage ou de circulation dans la plante. Chez la plante, ce composé joue un rôle dans l'interaction plante/micro-organisme. Sur le plan pharmacologique, cette molécule, extraite du saule, est utilisée en cosmétique dans de

nombreux traitements pour la peau (Figure 10a) (Arif, 2015). Son dérivé, l'acide acétylsalicylique, est le principe actif de l'aspirine (Figure 10b).

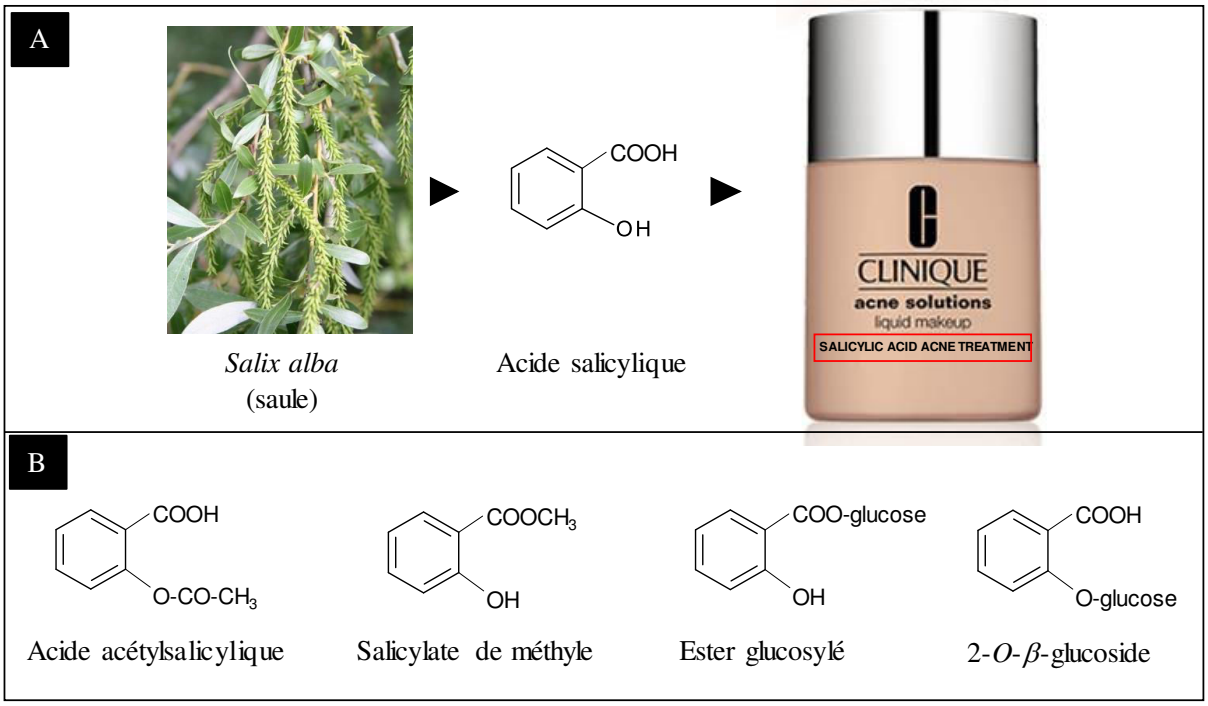


Figure 10 : a) Acide salicylique, extrait du saule, un ingrédient actif utilisé en cosmétique ; b) Dérivés naturels de l'acide salicylique. Source : https://gobotany.newenglandwild.org.

Les acides hydroxybenzoïques sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal, en particulier de la lignine et de certains tanins. Peu de données dans la littérature décrivent leur voie de biosynthèse. Deux voies ont été proposées à partir du *t*-cinnamate. La première, décrite chez le pétunia, est une voie oxydative qui met en jeu une 3-kéto-acyl-CoA-thiolase *via* un coenzyme A (CoA) (Van Moerkercke *et al.*, 2009). La deuxième, décrite chez le muflier, est une voie non-oxydative qui implique une benzadéhyde déshydrogénase *via* un benzoyl-CoA et un benzaldéhyde (Long *et al.*, 2009). L'acide salicylique est formé à partir de l'acide benzoïque par une 2-hydroxylase de la famille des cytochromes P450 mono-oxygénases (León *et al.*, 1995).

2.4.6 Les acides hydroxycinnamiques

La dernière classe de polyphénols correspond aux acides hydroxycinnamiques (Figure 11). Leur structure de base en C_6-C_3 dérive de celle de l'acide *t*-cinnamique. Les formes simples sont l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide synapique (Figure 11).

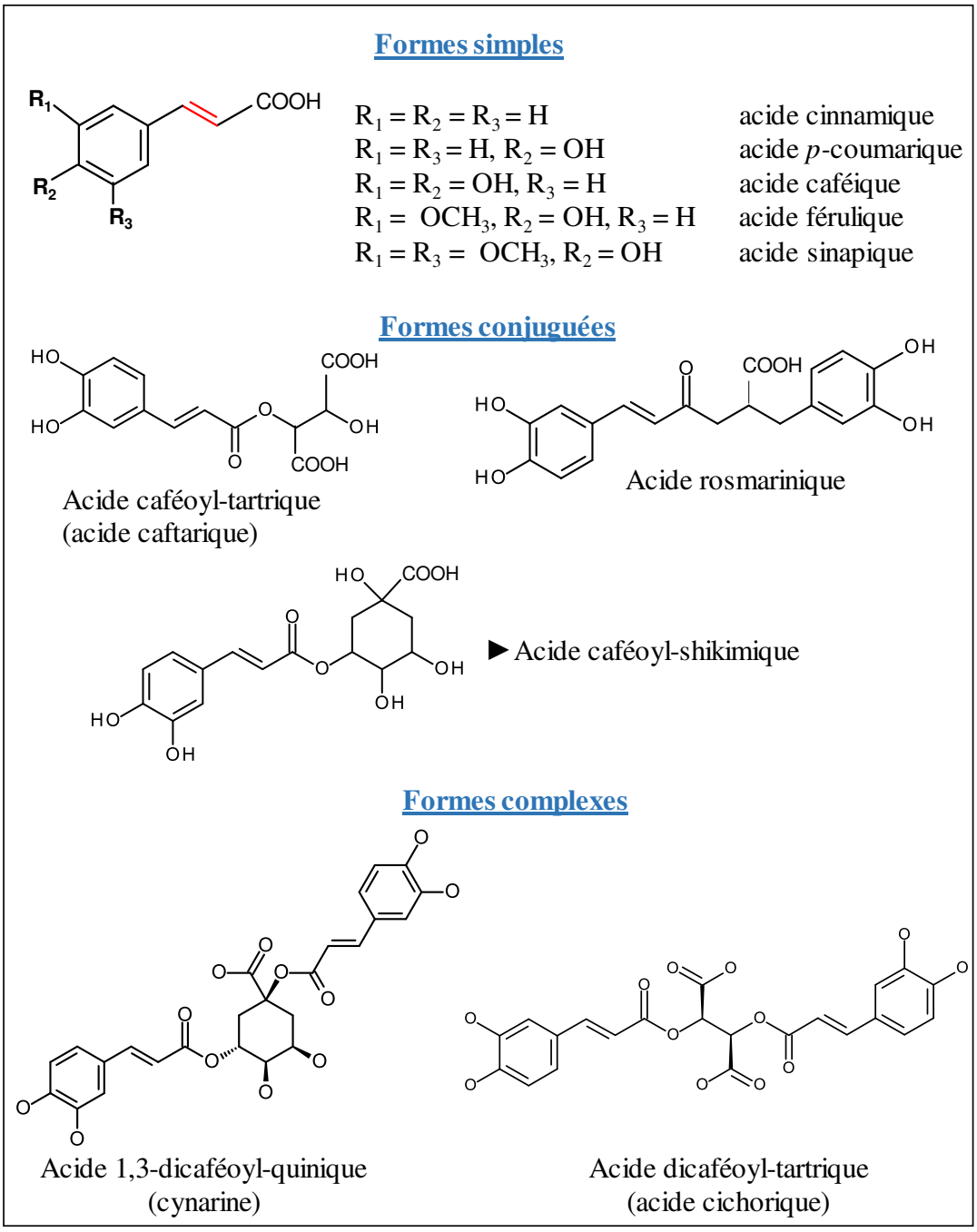


Figure 11 : Structure de base des formes simples d'acides hydroxycinnamiques et principales classes des formes simples et conjuguées. La double liaison dans la chaîne latérale est marquée en rouge.

Rarement présents à l'état libre, ces acides peuvent se conjuguer à d'autres molécules organiques. Les liaisons impliquent souvent la fonction carboxylique (R-COOH) conduisant alors à des esters avec le glucose ou avec différents alcools-acides comme les acides quinique, tartrique, et shikimique (Robards *et al.*, 1999). L'acide quinique peut être estérifié avec de l'acide caféique, de l'acide férulique, de l'acide *p*-coumarique et plus rarement de l'acide sinapique (Nishizawa *et al.*, 1987). Les liaisons peuvent également se faire par l'intermédiaire

de l'une des fonctions phénoliques, conduisant alors à des glucosides (Jaiswal et Kuhnert, 2010).

Les esters d'acides hydroxycinnamiques ont été mis en évidence chez de nombreux végétaux. On les trouve en quantité importante dans certains fruits comme la pomme, la cerise et la poire (Amiot *et al*., 1992 ; Gao et Mazza, 1995) et pour les légumes l'artichaut et la patate douce (Adzet et Puigmacia, 1985; Naczk et Shahidi, 2006; Harrison *et al*., 2008). L'acide caféique peut être estérifié par le tartrate générant l'acide caféoyl-tartrique (encore nommé acide caftarique ou CTA) (Figure 11) identifié chez le raisin (Zhang *et al*., 2013). D'autres molécules sont estérifiées par l'acide shikimique comme les acides caféoyl-shikimiques (Figure 11) présents dans la datte (Ziouti *et al*., 1996). Des molécules plus complexes résultant de multiples estérifications ont été décrites notamment chez le café (acides dicaféoyl-quiniques ou DCQ) et l'endive (acide cichorique ou diCTA) (Figure 11) (Fritsche *et al*., 2002; Jaiswal et Kuhnert, 2010; Lee et Scagel, 2013).

Enfin, il est intéressant de noter que ces acides hydroxycinnamiques forment les éléments constitutifs de la lignine et que l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale (Figure 11) est à l'origine de deux isomères (*cis* ou *trans*) dont la forme *trans* est naturellement prépondérante (Macoy *et al*., 2015).

Chez les végétaux, les acides hydroxycinnamiques ont un rôle dans la structuration de la paroi et dans la défense contre les pathogènes (Faulds et Williamson, 1999; Zhu *et al*., 2004). Ces molécules sont également à l'origine de caractéristiques organoleptiques particulières chez le café (Kaiser *et al*., 2013). Comme la plupart des molécules du métabolisme spécialisé, ces acides hydroxycinnamiques sont dotés de propriétés physico-chimiques remarquables et sont largement utilisés en cosmétologie et en pharmacologie. Les propriétés de ces molécules sont essentiellement liées au degré de fonctionnalisation du noyau benzénique au travers d'hydroxylations, de méthylations et d'estérifications (Teixeira *et al*., 2013).

Comme mentionné précédemment, les acides hydroxycinnamiques comptent un grand nombre de familles de molécules dont les acides caféoyl-quiniques et leurs dérivés. C'est sur cette famille que je me suis concentrée dans le cadre des travaux de ma thèse et que je vais aborder par la suite.

2.5 Les dérivés d'acide caféoyl-quinique

Comme précédemment évoqué (δ 2.2), les dérivés d'acide caféoyl-quinique présentent des propriétés antioxydantes valorisables en industrie. La société PAT souhaite produire ces molécules à de hauts rendements à destination du secteur cosmétique. Dans ce contexte, nous avons étudié de manière plus approfondie cette famille de composés en vue d'exploiter leur voie de biosynthèse par des approches d'ingénierie métabolique.

2.5.1 Description structurale des formes isomériques

Les acides caféoyl-quiniques sont une famille d'esters formés d'un acide quinique (Q) et d'acide caféique (C), regroupés sous le nom d'« acides chlorogéniques » (CGA) (Figure 12). Ils existent sous forme de plusieurs isomères dont la présence et l'abondance dépend de l'espèce végétale et du tissu considéré (Tableau 3) (Joët *et al*., 2009). L'acide néochlorogénique (5-CGA) résulte de l'estérification de l'acide caféique en position 5 sur l'acide quinique (Figure 12). Les formes mono-, di- et tri-esters et plus rarement les tétra-esters se distinguent par le nombre, et la position des résidus caféoyl sur l'acide quinique. De nombreuses plantes produisent des CGA par estérification sur les positions 3, 4 et 5 de l'acide quinique, et plus rarement en position 1 dont l'isoforme (1-CGA) est présente chez l'artichaut (Schütz *et al*., 2004; Clifford *et al*., 2005).

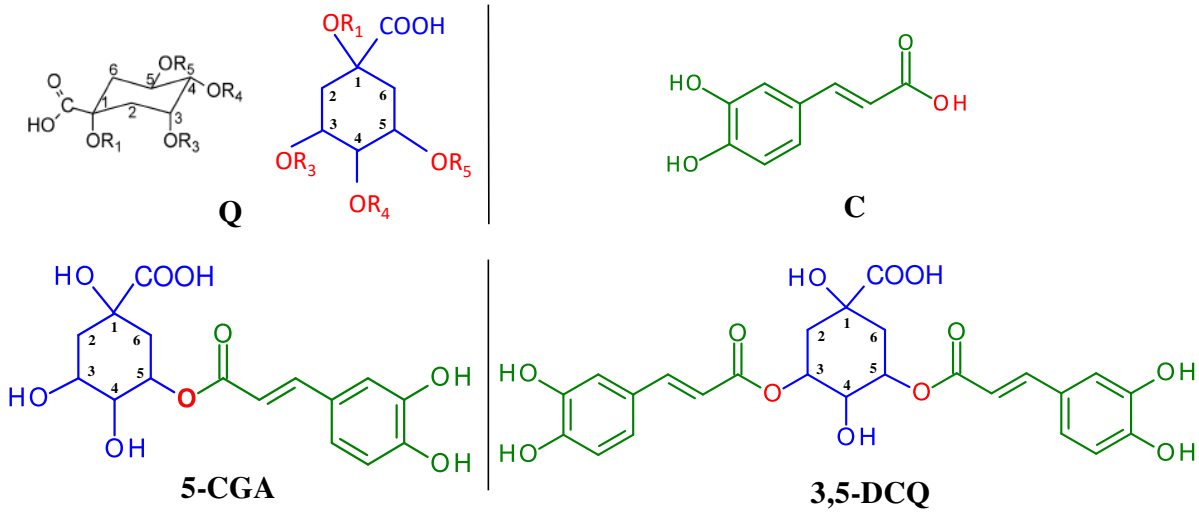


Figure 12 : Structures moléculaires des acides caféoyl-quiniques et exemples de dérivés. 5-CGA : acide 5-O-caféoyl-quinique ; 3,5-DCQ : acide 3 ,5-dicaféoyl-quinique. Q = acide quinique ; C = acide caféique. La structure colorée en vert correspond au groupement caféoyl.

Les acides dicaféoyl-quiniques (DCQs), également appelés acides isochlorogéniques, et les acides tri- et tétra-caféoyl-quiniques résultent de la condensation de plusieurs molécules d'acide chlorogénique (Eich, 2008; Guo *et al*., 2015). Par exemple, l'acide 3,5-dicaféoyl-quinique (3,5-DCQ) est formé par substitution du 5-CGA en position 3 par un groupement caféoyl d'une autre molécule d'acide chlorogénique (Figure 12). Cette molécule a été mise en évidence pour la première fois chez *Xanthium* et la pomme de terre (Taylor et Zucker, 1966). La cynarine (1,3-DCQ), une autre molécule identifiée chez l'artichaut, résulte d'une acylation en position 1 sur le noyau quinique de l'acide chlorogénique (Adzet et Puigmacia, 1985; Clifford *et al*., 2005).

Nom et abréviation	Synonyme	N° CAS	Nombre	R_1	R_3	R_4	R_5
Monesters d'acide							
1-*O*-caféoylquinique (1-CGA)		1241-87-8	I	C	H	H	H
3-*O*-caféoylquinique (3-CGA)		327-97-9	II	H	C	H	H
5-*O*-caféoylquinique (5-CGA)	néochlorogénique	906-33-2	III	H	H	H	C
4-*O*-caféoylquinique (4-CGA)	cryptochlorogénique	905-99-7	IV	H	H	C	H
Diesters d'acide							
1,3-di-*O*-caféoylquinique (1,3-DCQ)		30964-13-7	V	C	C	H	H
1,4-di-*O*-caféoylquinique (1,4-DCQ)		1182-34-9	VI	C	H	C	H
1,5-di-*O*-caféoylquinique (1,5-DCQ)		19870-46-3	VII	C	H	H	C
3,4-di-*O*-caféoylquinique (3,4-DCQ)	isochlorogénique B	14534-61-3	VIII	H	C	C	H
3,5-di-*O*-caféoylquinique (3,5-DCQ)	isochlorogénique A	2450-53-5	IX	H	C	H	C
4,5-di-*O*-caféoylquinique (4,5-DCQ)	isochlorogénique C	57378-72-0	X	H	H	C	C
Triesters d'acide							
1,3,5-tri-*O*-caféoylquinique (1,3,5-TCQ)		1073897-80-9	XI	C	C	H	C
3,4,5-tri-*O*-caféoylquinique (3,4,5-TCQ)		437611-66-0	XII	H	C	C	C

Tableau 3 : Les différents isomères d'acides caféoyl-quiniques classés sous forme monoester, diester ou triester. Le numéro CAS représente le numéro d'enregistrement unique à chaque substance auprès de la banque de données de Chemical Abstracts Service (CAS), division de l'American Chemical Society (ACS). La numérotation IUPAC représente la nomenclature des composés chimiques organiques. D'après Clifford et al, 2000 et 2005 et Pubchem (NCBI).

Les formes monomériques comme les 3- et 4-CGA et les formes dimériques comme le 3,4-DCQ et le 4,5-DCQ, peuvent être produits par *trans*-estérication chimique du 5-CGA et du 3,5-DCQ respectivement sous l'effet du pH (Friedman et Jurgens, 2000). Le 3,5-DCQ peut également s'isomériser en 4,5- par un transfert spontané du groupement acyle en position 3- ou 4- (Lallemand *et al.*, 2012). Les climats chauds favorisent les processus de trans-estérification car une isomérisation spontanée peut se produire sous l'effet de la chaleur (Hanson, 1965; Dawidowicz et Typek, 2010). Des chercheurs ont noté une isomérisation du CGA dépendante de la température dans les racines de stockage de patate douce après chauffage (Takenaka *et al.*, 2006). D'autres hypothèses penchent pour une isomérisation enzymatique (Joet *et al.*, 2010). A l'instar de la température, certains traitements chimiques ont un effet sur l'isomérisation. Par exemple, le 1,5-DCQ est converti entièrement en 1,3-DCQ et en 5-CGA après un traitement avec du tétraméthyl ammonium hydroxide (Clifford *et al.*, 1989).

2.5.2 Distribution dans le règne végétal

2.5.2.1 Les familles de plantes accumulatrices et quelques exemples de plantes médicinales

Les acides caféoyl-quiniques sont largement distribués dans le règne végétal (Clifford, 2000). Certaines familles de plantes comme les Astéracées, les Rosacées, les Solanacées ou les Rubiacées sont capables de les accumuler en fortes concentrations (Jaiswal *et al*., 2012; Murthy *et al*., 2014a). Parmi les acides hydroxycinnamiques, les esters d'acide caféique prédominent chez les Solanacées (Molgaard et Ravn, 1988). Elles ont, par exemple, été décrites et quantifiées chez la tomate, l'aubergine et la pomme de terre (Whitaker et Stommel, 2003; Mattila et Hellström, 2007; Erba *et al*., 2013).

L'acide chlorogénique est l'acide hydroxycinnamique le plus répandu chez les végétaux, majoritairement sous la forme 5-CGA. Les feuilles d'artichaut, par exemple, accumulent les acides caféoyl-quiniques jusqu'à 4% de matière sèche principalement sous forme 5-CGA (Hausler *et al*., 2002). Cependant, l'isomère 3-CGA est la forme majoritaire chez les Brassicacées et les fruits à noyaux comme la prune (Nakatani *et al*., 2000). Parmi les Rubiacées, le café est une source d'acides caféoyl-quiniques avec 45 formes différentes représentant jusqu'à 8% de la matière sèche dont 70% est du 5-CGA (Campa *et al*., 2003 ; Jaiswal *et al*., 2010a ; Kuhnert *et al*., 2011).

Plante	**Patate douce**		**Artichaut**	**Café**	**Tomate**
Famille	Convolvulacée		Astéracée	Rubiacée	Solanacée
Partie de la plante	racines	feuilles	feuilles	graines de café	fruit
Forme majoritaire de DCQ	**3,5-DCQ**	**3,5-DCQ**	**1,3-DCQ**	**3,5-DCQ**	**3,4-DCQ**
Teneur moyenne en % (g/100g) ou en mg/g de matière sèche	3 mg/100g	0,9-3 %	1 %	0,9 %	1,3 mg/100g
Références	Bellail *et al*, 2012	Islam *et al* 2002	Wang *et al*, 2003; Moglia *et al*, 2008	Duarte *et al*, 2010	Chanforan *et al*, 2012

Tableau 4 : Les formes majoritaires de DCQ (acide dicaféoyl-quinique) et leurs teneurs dans plusieurs familles de plantes accumulatrices.

Pour ce qui est des formes complexes, les isomères d'acides di- et tri-caféoyl-quiniques sont plus rares dans les plantes et leurs concentrations peuvent varier au sein d'une espèce voire même entre les variétés ou les tissus au sein d'une même plante (Tableau 4). Par exemple, le 3,4,5-TCQ a été détecté dans les graines mâtures de café Robusta mais il est absent chez la variété Arabica (Jaiswal et Kuhnert, 2010). Le 3,5-DCQ semble être l'isoforme de DCQ la plus rencontrée (da Silva *et al*., 2006). Les isomères 3,4-, et 4,5-DCQ sont trouvés chez de nombreuses autres espèces comme le café, la tomate et la laitue (Ke et Saltveit, 1988; Duarte *et al*., 2010 ; Chanforan *et al*., 2012). Dans les feuilles d'artichaut, l'acide 1,3-DCQ (cynarine) est le principal isomère (Moglia *et al*., 2008). Si cette disparité est liée à la famille de plante considérée, elle provient également de la synthèse des molécules qui semble être régulée de manière spatio-temporelle au sein d'un même individu. Chez le café, ces molécules sont généralement produites au moment de la phase d'expansion de l'endoderme (Jaiswal *et al*., 2012). Le 5-CGA et le 3,5-DCQ sont accumulés très tôt pendant la phase de développement de la graine mais dans un temps très court du fait de la croissance de l'endoderme et de leur remobilisation partielle pour la synthèse de lignine. La teneur en 3,5-DCQ est plus forte dans les graines immatures et diminue au fur et à mesure de la maturité (Joët *et al*., 2009). Chez d'autres plantes, cette distribution temporelle est différente. Par exemple chez la tomate, leur teneur atteint son maximum dans les fruits entièrement mûrs et plus particulièrement dans la peau (Moglia *et al*., 2014).

Ces composés sont également particulièrement trouvés dans de nombreuses plantes médicinales connues pour certains effets thérapeutiques (Tableau 5). Commercialisée dans les officines pharmaceutiques, l'échinacée est une plante médicinale utilisée pour le traitement du rhume (*Echinacea purpurea*), ou encore comme phyto-immunostimulant pour le traitement des allergies (*E. pallida* et *E. angustifolia*) (Bauer *et al*., 1988 ; Hudson, 2010). Cette plante est riche en esters d'acide caféique de types glycosides (ex : échinacoside), acides caféoyl-quiniques (CGA, DCQs) et en esters d'acide tartrique (ex : acide caftarique) (Pietta *et al*., 1998). L'espèce *Echinacea angustifolia* contient particulièrement dans ses racines du 1,3-DCQ, réputé pour ses propriétés cholérétiques et cholagogues (Speroni *et al*., 2002; Murthy *et al*., 2014b).

Famille de plantes	Exemples d'espèces	Parties de la plante	Esters caféiques	Utilisations médicinales/ alimentaires	Références
Astéracées	*Laggera alata* D.	feuilles	**3,4-DCQ**	Anti-hépatite B	Wu *et al*, 2012
	Cynara cardunculus L.	feuilles	1-CGA, **5-CGA, 1,3-DCQ**, 1,5-DCQ	Hépatoprotecteur, cholérétique et diurétique	Zhu *et al*, 2004
	Echinacea angustifolia L.	racines	5-CGA, acide caftarique, **1,3-DCQ**, 1,4-DCQ, 3,4-, 3,5-DCQ, **échinacoside**	Anti-inflammatoire, cicatrisante, immunostimulant	Murthy *et al*, 2014; Speroni *et al*, 2002
	Chrysanthemum coronarium L.	feuilles	**5-CGA**, 3,5-DCQ	Hypotenseur	Clifford *et al*, 2000
Solanacées	*Solanum lycopersicum* L.	fruit	**5-CGA**, 3,4-, 3,5-, 4,5-DCQ, TCQs	Réduction des maladies cardiovasculaires	Chanforan *et al*, 2012
Dipsacacées	*Dipsacus asper* W.	racines	3,4-, 3,5-, 4,5-DCQ	Analgésique, anti-inflammatoire	Hung *et al*, 2006

Tableau 5 : Exemples de familles de plantes médicinales et alimentaires contenant des acides caféoyl-quiniques et dérivés. En caractères gras sont les acides caféoyl-quiniques utilisés comme principes actifs.

2.5.2.2 La localisation cellulaire et tissulaire

Beaucoup de métabolites spécialisés hydrophiles sont stockés dans la vacuole, alors que les molécules hydrophobes sont localisées dans la membrane plasmique, les vésicules membranaires ou la paroi (Wilson et Roberts, 2012). Dans ce second cas, l'extraction des molécules s'avère plus complexe car elle nécessite l'utilisation de procédés particuliers comme l'utilisation de cellulase impliquant de nombreux traitements. C'est le cas par exemple du paclitaxel dont 90% s'accumule dans la paroi.

Le cas des acides caféoyl-quiniques est un peu particulier. On les retrouve sous forme libre et soluble dans le compartiment intracellulaire et ils peuvent former des complexes avec l'acide caféique dans la vacuole (Waldhauser et Baumann, 1996). Comme cela a déjà été mentionné précédemment, ces molécules font également partie intégrante des lignines. Dans ce cas, les molécules ne sont bien entendu plus solubles. Ces dérivés d'acide caféoyl-quinique sont alors considérés comme des formes de stockage (Aerts et Baumann, 1994; Schoch *et al*., 2001).

Du point de vue histologique, ces molécules ont souvent été mises en évidence dans la peau et les tissus externes de racines (Harrison *et al*., 2003).

2.5.3 Rôles physiologiques dans la plante

2.5.3.1 Rôles anti-microbiens

De nombreux travaux ont permis de démontrer que les acides caféoyl-quiniques jouaient un rôle important dans la défense des plantes contre les agressions par divers pathogènes. Il a ainsi été démontré que la concentration en acide chlorogénique augmentait de manière significative lors d'attaque par des virus, des bactéries ou des champignons (Harrison *et al*., 2008).

L'effet anti-fongique des acides caféoyl-quiniques a été mis en évidence chez *Helianthus tuberosus*. Des extraits de feuilles inhibent la croissance de certains champignons phytopathogènes comme *Botrytis cinerea* ou *Phytophthora capsicii*. L'analyse phytochimique de la fraction active révèle la présence d'acide chlorogénique, de cynarine (1,3-DCQ), de 1,5-, de 3,4-, de 3,5- et de 4,5-DCQ (Chen *et al*., 2013). Cette étude montre aussi que le 3,4-DCQ et le 1,5-DCQ sont les composés les plus actifs contre *Gibberella zeae*, un agent pathogène responsable de fusarioses chez le maïs et le blé (Chen *et al*., 2013). Le 3,5-DCQ inhibe la croissance de *Rhizopus stolonifer*, un pathogène fongique responsable des maladies post-récolte chez la patate douce (Stange Jr *et al*., 2001). Dans le même ordre d'idée, la croissance de *Fusarium solani* est inhibée par l'acide caféique, l'acide chlorogénique et le 3,5-DCQ (Harrison *et al*., 2001).

En parallèle des propriétés anti-fongiques, ces molécules disposent également de propriétés anti-bactériennes. Certains travaux mettent en exergue une spécificité entre le type d'acide caféoyl-quinique et la nature de l'agent microbien. Au travers des travaux de Zhu et ses collaborateurs, on peut voir que les dérivés d'acide caféoyl-quinique, identifiés dans des extraits de feuilles de *Cynara scolymus*, agissent presque tous contre les six bactéries testées, tandis que l'acide caféique, le 3,5- et le 4,5-DCQ n'ont aucun effet (Zhu *et al*., 2004). D'autres travaux montrent que l'acide chlorogénique et le 3,4-DCQ inhibent la croissance de *Pseudomonas syringae* chez la tomate, tandis que la croissance de *Erwinia chrysanthemi* est uniquement bloquée par le 4,5-DCQ (Pilar Lopez-Gresa *et al*., 2011).

Les diverses propriétés anti-microbiennes de ces molécules présentent un intérêt dans la conservation des fruits et des légumes au cours de leur stockage (Gyawali et Ibrahim, 2014).

2.5.3.2 Rôles allélopathiques

Des travaux réalisés par Cipollini et ses collaborateurs mettent en évidence chez *Lonicera maackii* l'effet inhibiteur de l'acide chlorogénique sur la croissance d'*Arabidopsis thaliana* (Cipollini *et al*., 2008b). De nombreux autres articles soulignent les propriétés allélopathiques des acides caféoylquiniques. Par exemple, des travaux publiés par Beninger et ses collaborateurs indiquent que ces molécules pouvaient avoir des propriétés allélopathiques, notamment dans la compétition avec d'autres végétaux en empêchant la croissance d'autres plantes. Ils ont montré que l'acide chlorogénique et le 3,5-DCQ extraits des feuilles de *Chrysanthemum morifolium* avaient un effet herbicide sur la lentille d'eau qui se traduit par une réduction de la photosynthèse et de la croissance cellulaire (Beninger *et al*., 2004). De même, d'autres chercheurs ont observé que des extraits racinaires de *Mikania micrantha* inhibent la germination des graines et la croissance des tiges d'Arabidopsis et l'analyse phytochimique de cet extrait révèle que le 3,5-DCQ est la substance active (Xu *et al*., 2013).

2.5.3.3 Autres rôles

Les acides phénoliques sont considérés comme des composés importants dans les défenses induites ou constitutives contre les agressions par des herbivores. Ces mécanismes de défense peuvent se mettre en place très rapidement après la blessure d'une feuille et se caractérisent par une accumulation d'acide chlorogénique (Matsuda *et al*., 2003a). Summers et Felton postulent que ces mécanismes de défense sont liés à l'effet pro-oxydant de l'acide caféique et de l'acide chlorogénique qui induit un stress oxydatif dans les tissus digestifs de larves de lépidoptères identifiés comme des ravageurs du maïs (Summers et Felton, 1994). Dans d'autres cas, la protection des plantes agressées se traduit par une réduction des protéines de digestion et de la biodisponibilité des acides aminés chez les insectes. C'est le cas pour les larves de la fausse arpenteuse du chou dont la croissance est ralentie en présence d'acide chlorogénique et d'acide 3,5-DCQ présent dans un extrait de feuilles de chrysanthème (Beninger *et al*., 2004).

Comme nous l'avons vu, ces molécules sont donc essentielles pour les plantes et jouent un rôle primordial contre les agressions biotiques. Des travaux récents montrent que ces molécules protègent aussi les plantes contre des agressions abiotiques. Des analyses d'histo-localisation dans les feuilles de café indiquent que les acides caféoyl-quiniques sont localisés dans les jeunes feuilles et plus précisément dans les cellules du chlorenchyme qui sont associées aux chloroplastes. Sur la base de ces observations, certains auteurs émettent l'hypothèse d'un rôle dans la protection contre la lumière (Mondolot *et al*., 2006). Ces travaux sont corroborés par une étude sur des extraits de feuilles d'artichaut qui met en évidence, par des approches de transcriptomique et de biochimie, le rôle des DCQs dans la protection contre les UV-C (Moglia *et al*., 2008).

2.5.4 Applications thérapeutiques

Activité thérapeutique	Molécules caféoylquiniques actives	Références
Anti-inflammatoire	3,4-DCQ; 3,5-DCQ; 4,5-DCQ 1,5-DCQ	Zhong *et al*, 2015
Antioxydante	4,5-DCQ; 3,5-DCQ; 3,4-DCQ; 1,5-DCQ > acide caféique > CGA	Yang *et al*, 2013; Kim *et al*, 2011; Cao *et al*, 2010
Anti-VIH	3,4,5-TCQ; 3,5-DCQ; 4,5-DCQ 3,4-DCQ 1,4,5-TCQ	Heyman *et al*, 2015 Tamura *et al*, 2006
Anti-hépatite B	3,4-DCQ	Wu *et al*, 2012
Effet neuro-protecteur	3,5-DCQ, 3,4-DCQ; 1,5-DCQ	Kim *et al*, 2005
Anti-collagénase	3,5-DCQ, 4,5-DCQ	Teramachi *et al*, 2005
Anti-spasmodique	3,5-DCQ	Trute *et al*, 1997
Effet hépato-protecteur	4,5-, 3,4, 3,5-DCQ	Wu *et al*, 2009
Anti-cholestérol	3,4-, 3,5-, 4,5-DCQ	Hung *et al*, 2006
Anti-tyrosinase	3,5-, 3,4-, 4,5-DCQ, CGA	Iwai *et al*, 2004
Chémoprévention	3,5-, 3,4-, 4,5-DCQ, CGA	Iwai *et al*, 2004
Anti-mutagène	3,4,5-TCQ > 3,4-DCQ > 3,5-DCQ = 4,5-DCQ > 3-CGA	Yoshimoto *et al*, 2002

Tableau 6 : Exemples de propriétés biologiques conférées par les acides caféoyl-quiniques et dérivés.

Certains métabolites spécialisés sont des molécules actives dotées de propriétés physico-chimiques remarquables. Les dérivés d'acide caféoyl-quinique en font partie. Nous avons vu jusque-là que ces molécules étaient essentielles pour la plante, mais de nombreuses études ont également révélé les effets bénéfiques de ces molécules sur la santé humaine (Tableau 6). Ces composés ont de fait attiré l'attention pour leurs intérêts thérapeutiques en tant que « phyto-nutriments » ou en tant que produits phyto-pharmaceutiques.

2.5.4.1 Antioxydant

Il a été prouvé que les acides hydroxycinnamiques présentent un intérêt thérapeutique grâce à des propriétés antioxydantes liées à leur capacité à piéger les radicaux libres (Teixeira *et al*., 2013). Ces molécules sont capables de protéger le corps humain contre le stress oxydatif, mis en cause dans de nombreuses maladies dont le cancer et les maladies cardiovasculaires (Kurata *et al*., 2007 ; Zhu *et al*., 2010). L'acide chlorogénique est d'ores et déjà utilisé dans les compléments alimentaires et joue un rôle dans la prévention des diabètes de type 2 par inhibition de l'absorption du glucose intestinal et exerce des effets anti-carcinogènes en agissant sur la réparation de l'ADN (Kono *et al*., 1995 ; Shibata *et al*., 1999; Kasai *et al*., 2000). Les molécules plus complexes, comme les acides dicaféoyl-quiniques extraits de plantes médicinales ont un large spectre de propriétés pharmacologiques, comme le résume le Tableau 6. Islam montre que ces molécules ont des activités antioxydantes quasiment deux fois plus importantes que l'acide chlorogénique ou que le tocophérol et l'acide ascorbique qui sont les antioxydants de référence (Islam, 2006). Cette différence d'efficacité est en lien direct avec le nombre de résidus caféoyl présents sur la molécule (Iwai *et al*., 2004 ; Harrison *et al*., 2008). Les 3,4-, 3,5- et 4,5-DCQ inhibent la peroxydation des lipides, ayant pour effet de diminuer l'accumulation du mauvais cholestérol (LDL), et peuvent être utilisés pour le traitement de l'athérosclérose (Hung *et al*., 2006). Les composés caféoyl-quiniques ont également une activité anti-hyperglycémique (Guan *et al*., 2006).

2.5.4.2 Inhibiteurs d'enzymes

Les scientifiques et les industriels ont rapidement compris les avantages que l'on pouvait tirer de ces molécules, notamment dans le domaine de la cosmétologie. Par exemple, certaines études indiquent que les acides dicaféoyl-quiniques inhibent l'activité de la tyrosinase, une enzyme impliquée dans la pigmentation de la peau et empêchent par-là, la formation de dopachrome à partir de la L-tyrosine. Cette propriété est recherchée en cosmétique pour le blanchiment de la peau. Leur activité est plus forte que les inhibiteurs conventionnels tels que l'acide chlorogénique, l'arbutine et l'acide ascorbique. La présence de la double liaison en position C7 du groupement caféoyl semble être essentielle à cette activité anti-tyrosinase (Iwai *et al*., 2004). Le 3,5- et le 4,5-DCQ inhibent également la collagénase qui est responsable de la réduction du collagène. Le collagène maintient l'élasticité et cette propriété est importante pour empêcher le vieillissement de la peau. L'acide caféique est moins efficace que les 3,5- et 4,5-DCQ semblant indiquer que le nombre de groupements caféoyl estérifiés augmente cette activité (Teramachi *et al*., 2005).

Mais le domaine cosmétique n'est pas le seul à pouvoir tirer des bénéfices de ces molécules. Les DCQs, isolés des plantes médicinales traditionnelles, sont des inhibiteurs de l'intégrase du VIH, ce qui empêche la réplication de l'ADN du virus (Zhu *et al*., 1999). Une étude a montré par des outils de « target-binding » (étude du mode de liaison des molécules) que le 3,4-DCQ

se lie à un complexe inhibiteur de l'intégrase (Hu *et al*., 2010). Les isomères de DCQ les plus actifs sont les 3,4- et 3,5-DCQ et le 3,4,5-TCQ semble avoir l'activité spécifique la plus forte (Wu *et al*., 2012). Les DCQs et TCQs peuvent être considérés comme des candidats potentiels pour le développement de nouveaux médicaments pour des combinaisons thérapeutiques de l'infection du VIH (Tamura *et al*., 2006).

2.5.4.3 Anti-inflammatoire

Certains travaux montrent que les activités anti-inflammatoires et antioxydantes des acides caféoyl-quiniques contribuaient à une activité hépato-protectrice (Wu *et al*., 2012). En effet, un extrait d'acides phénoliques (dont les composés majoritaires sont le 3,4-, le 3,5 et le 4,5-DCQ) contenus dans *Laggera alata* a un effet hépato-protecteur (Wu *et al*., 2009). Une autre étude indique que les formes 1,5-, 3,4-, 3,5- et 4,5-DCQ contenus dans un extrait de *Kalimeris indica* ont une activité anti-inflammatoire et inhibent la production de NO et des cytokines TNF-α (Zhong *et al*., 2015). En revanche, un travail plus ancien indique que le 3,4,5-TCQ n'a pas d'activité anti-inflammatoire (Peluso *et al*., 1995).

2.5.4.4 Neuroprotecteur

En luttant contre le stress oxydatif des neurones, les acides dicaféoyl-quiniques ont des effets neuroprotecteurs. Des travaux traitant de l'effet du 3,5-DCQ sur l'apoptose des neurones indiquent une diminution de la mort cellulaire causée par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si le 3,5-DCQ a un effet neuroprotecteur à 50µM, il peut cependant engendrer un effet cytotoxique au-delà de cette concentration (Kim *et al*., 2005). Le 3,5-DCQ peut être un agent thérapeutique potentiel pour le traitement ou le ralentissement des maladies neurodégénératives comme l'Alzheimer et le Parkinson. Similairement, le 1,5-DCQ protège les astrocytes de la mort cellulaire causée par le stress oxydatif en piégeant les radicaux libres (Cao *et al*., 2010).

2.5.4.5 Anti-cancer

Les DCQ montrent également une activité anti-prolifération des cellules cancéreuses plus fortes que les acides mono-caféoylquiniques. Ces composés servent d'agents de protection contre les espèces réactives à l'oxygène et peuvent être utilisés pour des traitements chémopréventifs (Iwai *et al*., 2004).

2.5.4.6 Rôle anti-malarial

Des auteurs ont montré que des extraits d'*Artemisia annua* contenaient des acides mono-, di- et tri-caféoyl-quiniques impliqués dans la résistance contre le parasite *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable de la malaria. Les acides 3,4- et 4,5-DCQ ont des activités inhibitrices sur le pathogène, comparables à celles de l'artémisinine. Ces molécules exercent également un effet synergique avec d'autres substances actives. Par exemple, l'acide chlorogénique (3-CGA) et l'acide rosmarinique potentialisent l'effet de l'artémisinine (Suberu *et al*., 2013).

2.5.5 Voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique

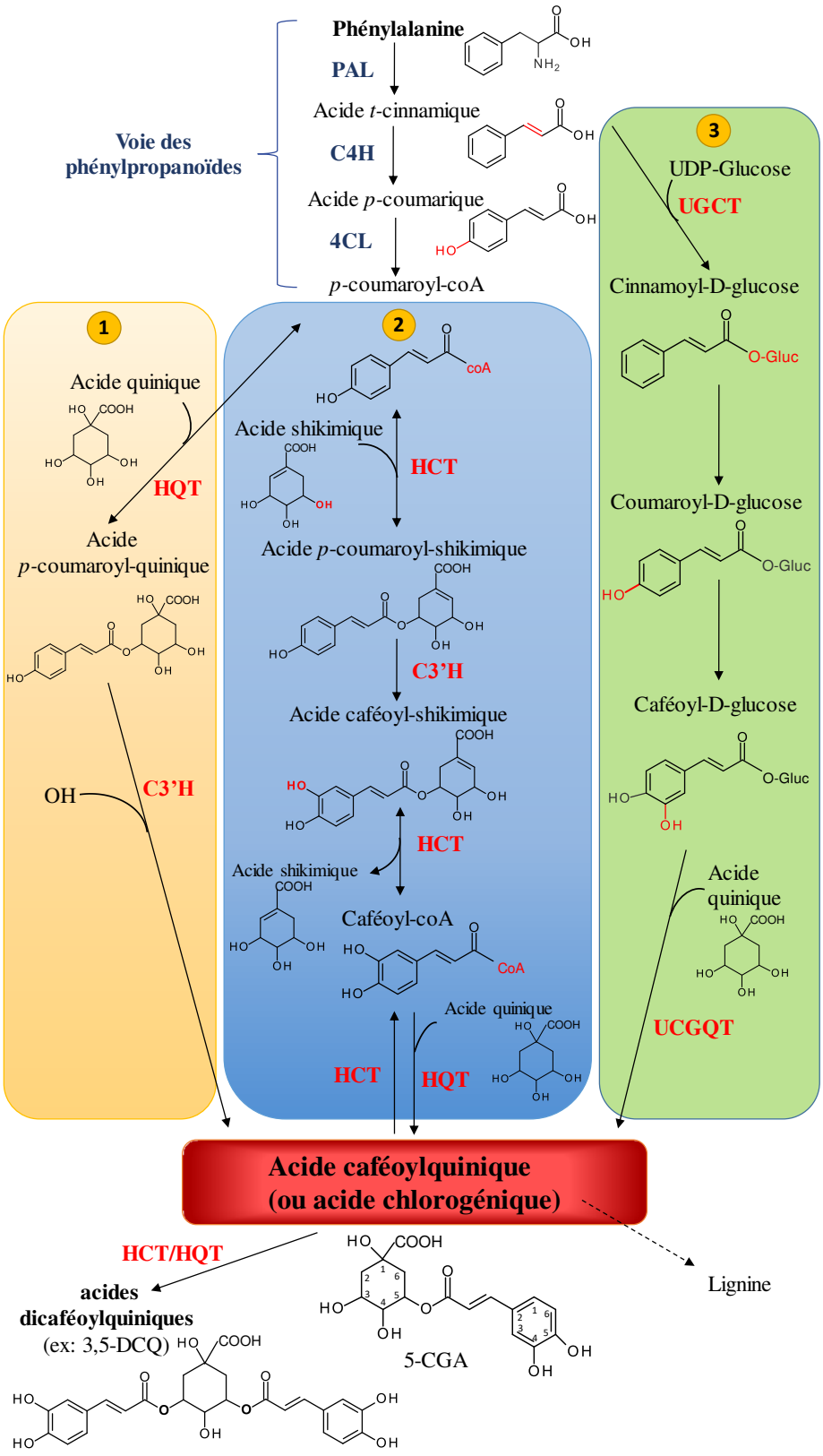


Figure 13 : Représentation simplifiée des voies proposées pour la biosynthèse d'acide chlorogénique chez les plantes. Les 3 voies possibles sont encadrées et numérotées 1, 2 et 3.

UGCGT : UDP glucose : cinnamate glucosyl transférase ; UCGQT : Hydroxycinnamoyl D-glucose : quinate hydroxycinnamoyl transférase (Hoffmann et al., 2003 ; Niggeweg et al., 2004 ; Schoch et al., 2001 ; Villegas et Kojima, 1986).

La voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique a fait l'objet de nombreuses recherches détaillées chez différentes espèces de Solanacées. **Trois voies sont proposées pour sa biosynthèse** (Figure 13) (Villegas et Kojima, 1986 ; Schoch *et al*., 2001 ; Hoffmann *et al*., 2003; Schoch *et al*., 2001) :

- La première voie se déroule en deux étapes enzymatiques : la *trans*-estérification du *p*-coumaroyl-CoA sur l'acide quinique est suivie par l'hydroxylation en position 3 sur le noyau aromatique du *p*-coumaroyl-quinate pour former le 5-CGA.

L'étape d'hydroxylation par la *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase (C3'H) a été caractérisée pour la première fois chez *Arabidopsis thaliana*. Par des approches de génomique fonctionnelle, il a été montré que cette enzyme de la famille des cytochromes P450 peut réagir avec soit le *p*-coumaroyl-shikimate, soit le *p*-coumaroyl-quinate pour former les dérivés d'acide caféique correspondants (Schoch *et al*., 2001). Chez le café, cette enzyme est codée par deux gènes dont les fonctions sont clairement distinctes par rapport à la spécificité du substrat (Mahesh *et al*., 2007). Cette voie semble être privilégiée chez les Solanacées et le café (Niggeweg *et al*., 2004; Comino *et al*., 2009; Joet *et al*., 2010).

- **La deuxième voie** implique 4 étapes : 1) l'estérification de l'acide shikimique sur le *p*-coumaroyl-CoA ; 2) l'hydroxylation du *p*-coumaroyl-shikimate pour former l'acide caféoyl-shikimique ; 3) sa désestérification pour produire du caféoyl-CoA ; lui-même de nouveau estérifié avec de l'acide quinique pour former le 5-CGA (4). Cette voie semble être empruntée chez l'artichaut et mais aussi chez le café (Comino *et al*., 2007, 2009 ; Joet *et al*., 2010).

- **La troisième voie** a été décrite pour la première fois chez la patate douce par les travaux de Villegas et Kojima en 1986. Cette étude explique que le CGA est synthétisé par *trans*-estérification entre un caféoyl-D-glucose et un acide quinique sous l'action d'une hydroxycinnamoyl D-glucose : quinate hydroxycinnamoyl transférase (UCGQT) (Villegas et Kojima, 1986).

2.5.6 Voie de biosynthèse des acides dicaféoyl-quiniques

Jusqu'à aujourd'hui, très peu de données dans la littérature décrivent la voie de biosynthèse des acides dicaféoyl-quiniques. Quelques études suggèrent que les acides dicaféoyl-quiniques dérivent de l'acide chlorogénique. Compte tenu de la similarité de structure de ces deux molécules, cette hypothèse semble être plausible.

La réaction de synthèse du DCQ a été pour la première fois abordée par des approches de traçage moléculaire. Ces travaux mentionnent que le 3,5-DCQ est détecté dans des disques foliaires de *Xanthium* après incubation avec de l'acide chlorogénique marqué au carbone ^{14}C

(Taylor et Zucker, 1966). Par ces mêmes approches, une autre expérimentation a été réalisée en 1985 sur un extrait brut protéique issu de racines de patate douce en présence de 3-CGA où l'on constate l'apparition d'acide isochlorogénique (3,5-DCQ), identifié par RMN. Ces résultats mettent en évidence une activité enzymatique appelée « isochlorogénate synthase » capable de catalyser la conversion de l'acide chlorogénique en acide isochlorogénique (Kojima et Kondo, 1985). Les observations faites par ces auteurs n'ont cependant pas été approfondies à l'échelle moléculaire jusque-là (Villegas *et al*., 1987). Des travaux récents réalisés par Legrand semblent indiquer que cette enzyme appartienne à la famille des lipases mais aucun gène n'a été identifié formellement à ce jour (Legrand, thèse 2015).

Bien que recherchée par de nombreux scientifiques, la caractérisation biochimique de la synthèse de ces molécules a été infructueuse pendant de nombreuses années. Plusieurs hypothèses penchent pour l'implication d'une caféoyl-CoA/quinique caféoyl transférase (CQT) mais le mécanisme enzymatique n'a pas encore été identifié (Koshiro *et al*., 2007 ; Murthy *et al*., 2014b). Des travaux récents ont commencé à lever le voile sur la synthèse des acides dicaféoyl-quiniques et mettent en évidence le rôle des acyltransférases que nous allons détailler par la suite.

2.5.7 Rôle des acyltransférases de la famille des BAHD dans la synthèse des dérivés d'acide caféique

2.5.7.1 Définition de la famille des transférases BAHD

Les transférases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe fonctionnel d'une molécule à une autre. Ces enzymes sont très présentes chez les plantes et sont souvent impliquées dans la synthèse des métabolites spécialisés.

La mise en relation des séquences génétiques accessibles dans les banques de données bioinformatiques avec les caractéristiques biochimiques et structurales des enzymes a permis de mettre en évidence une cinquantaine de transférases regroupées sous une même famille dénommée « BAHD ». Cet acronyme correspond aux noms des quatre premières enzymes biochimiquement caractérisées de cette famille : la BEAT (benzylalcolol *O*-acetyl-transferase), l'AHCT (anthocyanin *O*-hydroxy-cinnamoyl transferase), l'HCBT (N-hydroxy-cinnamoyl-benzoyl transferase) et la DAT (deacetylvindoline 4-*O*-acetyl transferase) (St-Pierre et De Luca, 2000a). On trouve ainsi dans cette famille les benzoyl/hydroxycinnamoyl acyltransférases comme la HCBT identifiée chez *Dianthus caryophyllus* (Yang *et al*., 1997) ou encore l'AHCT isolée de *Gentiana trifolia* (Fujiwara *et al*., 1998). On y trouve également des acétyltransférases comme la BEAT, isolée chez *Clarkia breweri* (Dudareva *et al*., 1998) et la DAT identifiée chez *Catharanthus roseus* (St-Pierre *et al*., 1998).

Les BAHD caractérisées à ce jour sont toutes des enzymes monomériques avec un poids moléculaire compris entre 48 et 55 kDa. Puisqu'aucun peptide signal ou autre séquence

d'adressage vers un organite n'a été identifié, la localisation de ces enzymes semble être cytosolique. Les séquences peptidiques de ces enzymes sont relativement proches et partagent au moins 25% d'identité (Ma *et al*., 2005).

2.5.7.2 Les motifs conservés des BAHD

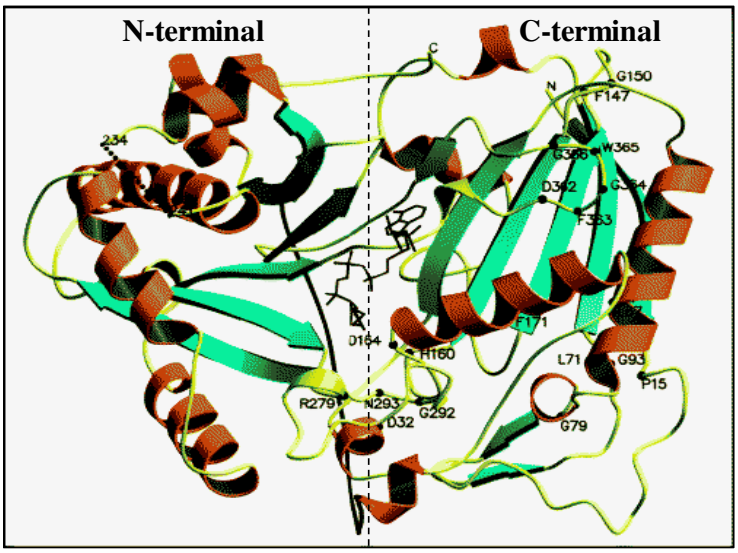


Figure 14 : Structure cristallisée de la vinorine synthase. Diagramme représentant la première structure d'une acyltransférase BAHD. L'acétyl-coenzyme A est présent vers le centre de la structure et dessiné en noir. Les hélices α sont représentées en rouge-orange et les brins β en vert (D'Auria, 2006).

Ces enzymes ont en commun dans leur séquence peptidique des motifs conservés. Le premier domaine **HXXXD** (His153-Asp157), localisé dans la région centrale de l'enzyme (Figure 14), est présent chez toutes les acyltransférases qui utilisent le thio-ester de CoA comme donneur d'acyle (par exemple le caféoyl-CoA). Ce motif a été démontré comme étant important dans la fonction catalytique de transfert d'acétyle par les chloramphénicol acétyltransférases (CAT) (Shaw, 1992). Le résidu histidine (H) participe à la déprotonisation de l'oxygène ou de l'azote porté pas le substrat accepteur où va se greffer le groupement acyle du thio-ester de CoA (D'Auria, 2006).

L'autre région fortement conservée est le motif **DFGWG** (Asp^{382}-Gly^{386}) qui est localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine (Ma *et al*., 2005). Il a été montré par des approches de mutagénèse dirigée, que la modification de cette séquence entraînait une diminution considérable de l'activité enzymatique (Bayer *et al*., 2004). De plus, le motif faiblement conservé **LSXXLXXXYXXXG** (aminés acides 83-95) est présent dans presque toutes les séquences (Aharoni *et al*., 2000).

2.5.7.3 Fonction des BAHD

Les acyltransférases sont définies comme des enzymes capables de transférer un groupement acyle (R— C = O$^-$) sur une autre molécule. Les principales sources actives de donneurs d'acyle peuvent être des sucres ou des protéines, liées à un groupement acyle ou un coenzyme A thio-ester (CoA SH). L'acylation sur une fonction amine (NH_3) aboutit à la formation d'un amide. L'acylation peut également former un ester si elle se produit sur une fonction alcool (-OH).

2.5.7.4 Classification des BAHD

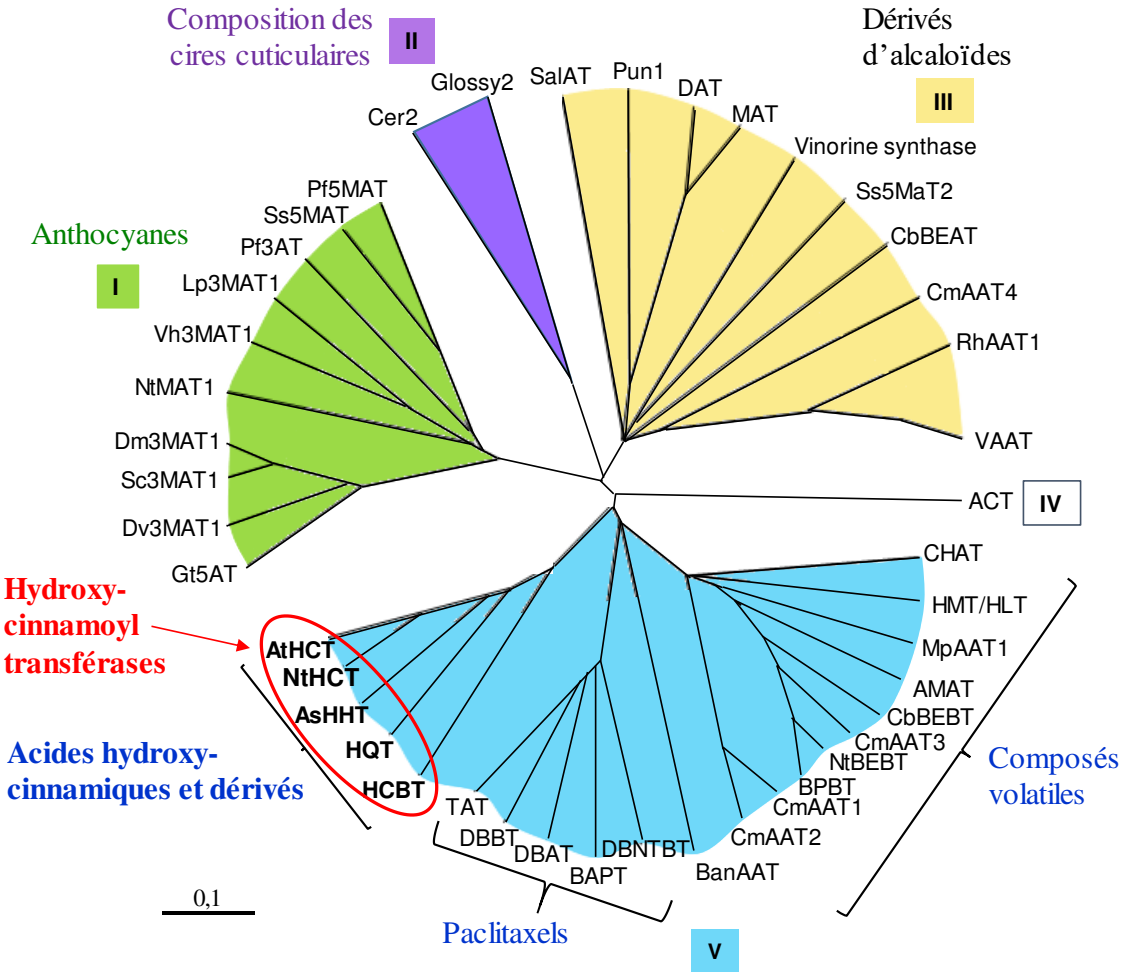


Figure 15 : Arbre phylogénétique de la superfamille BAHD des acyltransférases. Figure adaptée de D'Auria, 2006.

Afin de comprendre l'évolution de la fonction des transférases BAHD, l'analyse des séquences (peptidiques et nucléiques) et des caractéristiques biochimiques des enzymes a permis d'établir un arbre phylogénétique organisé en cinq clades principaux (Figure 15). Cette classification a été basée sur le type de substrat pris en charge et sur les conditions d'expression des enzymes et des gènes.

Certaines enzymes aux fonctions identiques ou proches appartiennent au même clade. Cette représentation distingue ainsi les enzymes impliquées dans la synthèse d'un large spectre de métabolites secondaires (Figure 15) (D'Auria, 2006).

- **Le clade I** comprend des membres de la famille des acyltransférases BAHD impliquées dans la synthèse des anthocyanes, notamment les anthocyanes acyltransférases (AAT) comme la Gt5AT responsable de la synthèse de la gentiodelphine qui colore en bleu les fleurs de la gentiane (Nakayama *et al*., 2003).

- **Le clade II** relie les deux gènes Glossy2 de *Zea mays* et CER2 d'*Arabidopsis thaliana* qui interviennent dans la production des cires épicuticulaires servant de barrières de protection et d'imperméabilité des tissus envers l'extérieur (Costaglioli *et al*., 2005).

- Le clade III regroupe les acétyltransférases qui acceptent les substrats alcool et utilisent pour la plupart l'acétyl-CoA comme donneur d'acyle. Une sous-famille de ce clade inclut les acétyltransférases responsables de la production des alcaloïdes, notamment des composés d'intérêt pharmaceutique comme la vindoline et la morphine (St-Pierre *et al.,* 1998; Grothe *et al*., 2001). Une autre sous-famille regroupe les acétyltransférases participant à la biosynthèse des esters volatiles chez certaines fleurs et certains fruits. On y trouve par exemple la RhAAT1 de *Rosa Hybrida* impliquée dans la production du géraniol caractérisé par une odeur de rose (Shalit *et al*., 2003).

- **Le clade IV** est représenté par l'agmatine coumaroyl transférase (ACT) que l'on retrouve chez l'orge. Cette enzyme catalyse la synthèse d'un précurseur de l'hordatine, un antifongique contre *Blumeria graminis* (Burhenne *et al*., 2003).

- **Le clade V** peut être subdivisé en plusieurs sous-groupes. Le premier sous-groupe comprend des acyltransférases comme la benzoyl coenzyme A : benzyl alcohol benzoyl transferase (BEBT) identifiée chez *Clarkia breweri* et impliquée dans la synthèse de benzyl benzoate volatile, un composant des parfums floraux (D'Auria *et al*., 2002). Le deuxième sous-groupe inclut les acyltransférases BAHD issues de *Taxus* spp. et impliquées dans la synthèse de paclitaxel, un alcaloïde utilisé comme anti-cancéreux (Hu *et al*., 2002). Le troisième sous-groupe comprend les enzymes qui catalysent le transfert d'un groupement hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA (donneur d'acyle) vers un substrat accepteur. Parmi ces enzymes se trouvent les hydroxycinnamoyl transférases impliquées dans la synthèse des dérivés d'acide caféique utilisés comme intermédiaires à la synthèse de lignine (Hoffmann *et al*., 2005).

2.5.7.5 Les hydroxycinnamoyl transférases

2.5.7.5.1 Présentation générale

Les hydroxycinnamoyl transférases jouent un rôle crucial dans la synthèse des esters d'acide caféique et de manière plus générale dans la protection de la plante contre les pathogènes et

dans le développement de la plante (Wagner *et al*., 2007 ; Sander et Petersen, 2011). Ces enzymes ont été identifiées chez de nombreuses plantes productrices d'esters hydroxycinnamiques comme la tomate, le café (Niggeweg *et al*., 2004; Lallemand *et al*., 2012) ou encore l'artichaut (Comino *et al*., 2007, 2009). Certaines d'entre elles ont été fonctionnellement caractérisées *in vitro* comme l'acide rosmarinique synthase (CbRAS) issue de *Coleus blumei*. Le clonage du gène correspondant et son expression chez *E. coli* a montré que l'enzyme contribue à la synthèse d'acide rosmarinique à partir d'acide 4-hydroxy-phényllactique et de *p*-coumaroyl-CoA (Sander et Petersen, 2011).

Dans d'autres cas, ces enzymes n'ont été décrites que sur le plan biochimique, l'identification des gènes correspondants reste encore à déterminer. Ainsi chez la prêle, plusieurs hydroxycinnamoyl transférases ont été partiellement purifiées comme l'hydroxycinnamoyl-CoA:*meso*-tartrate hydroxycinnamoyl transférase (CTT) impliquée dans la synthèse d'acide caftarique (CTA) à partir d'acide tartrique couplé à un caféoyl-CoA. Une autre enzyme, l'hydroxycinnamoyl-CoA : caféoyl-*meso*-tartrate hydroxycinnamoyl transférase (CCT), catalyse le transfert d'un caféoyl-CoA vers un deuxième CTA pour donner le diCTA (acide cichorique) (Hohlfeld *et al*., 1996). Plus tard, la même activité de synthèse de CTA a été décrite chez *Arachis glabrata via* une hydroxycinnamoyl-CoA : tartrate hydroxycinnamoyl transférase (HTT) (Sullivan, 2014).

Une autre catégorie de cette famille d'enzymes regroupe les hydroxycinnamoyl shikimate/quinate acyltransférases (HCT et HQT) capables de transférer un groupement caféoyl ou *p*-coumaroyl vers un acide quinique ou shikimique. Certaines d'entre elles ont été caractérisées au niveau moléculaire comme mentionné ci-après.

2.5.7.5.2 Les hydroxycinnamoyl shikimate/quinate acyltransférases (HCT et HQT)

2.5.7.5.2.1 Rôles dans la synthèse des acides caféoyl-quiniques

Deux gènes paralogues, codant deux enzymes, l'HCT et l'HQT, ont été identifiés chez les Solanacées et leur fonction enzymatique a été caractérisée par expression hétérologue. Le clonage de l'ADNc codant une hydroxycinnamoyl transférase (HCT) de tabac et la caractérisation fonctionnelle de l'enzyme correspondante exprimée dans un système bactérien montre que l'enzyme utilise le quinate comme donneur d'acyle et le caféoyl-CoA comme accepteur pour former du caféoyl-quinate (acide chlorogénique) (Hoffmann *et al*., 2003).

Une étude menée par des approches de transgénèse a mis en évidence le rôle de l'HQT dans la biosynthèse d'acide chlorogénique chez le tabac et la tomate. En effet, la production fortement diminuée d'acide chlorogénique suite à l'extinction du gène codant cette enzyme suggère que l'HQT est essentielle à la biosynthèse d'acide chlorogénique. D'après ces résultats, la voie 1 faisant intervenir l'HQT dans la synthèse de CGA (Figure 13) prédomine chez les Solanacées

(Niggeweg *et al*., 2004). D'autre part, la surexpression du gène codant cette enzyme chez la tomate conduit à une suraccumulation d'acide chlorogénique dans les feuilles, soulignant un rôle important dans l'accumulation du 5-CGA. Cette augmentation d'acide chlorogénique est corrélée à une augmentation de l'activité antioxydante et de la résistance aux infections bactériennes (Niggeweg *et al*., 2004).

Chez *Cynara cardunculus*, la même activité biosynthétique a été montrée par expression hétérologue des gènes codant l'HCT et l'HQT (Comino *et al*., 2007, 2009). Chez cette espèce, l'HCT présente une meilleure affinité pour le quinate que le shikimate et accepte préférentiellement le *p*-coumaroyl-CoA comme substrat, alors qu'elle a une meilleure affinité pour le shikimate chez les Solanacées et le café (Hoffmann *et al*., 2003 ; Niggeweg *et al*., 2004; Lallemand *et al*., 2012). L'HQT présente quasiment les mêmes activités, à l'exception que celle-ci n'utilise pas ou très peu le shikimate comme substrat. Ces résultats nous font déduire que la fonction de l'HQT est plus affiliée à la voie 1 pour la synthèse de *p*-coumaroyl-quinate et à la dernière étape de la voie 2, c'est-à-dire la conversion du caféoyl-CoA et de l'acide quinique en acide chlorogénique (Figure 13) (Comino *et al*., 2007, 2009).

2.5.7.5.2.2 Rôles dans la synthèse des acides dicaféoyl-quiniques

Récemment ces enzymes ont été décrites pour une nouvelle activité, celle de la synthèse des acides dicaféoyl-quiniques. Pour la première fois, une HCT impliquée dans ce rôle a été identifiée chez *Coffea canephora* et a été étudiée par une méthode d'expression hétérologue en système bactérien. La caractérisation biochimique de la protéine recombinante montre que cette enzyme catalyse la réaction entre deux molécules de 5-CGA et un coenzyme A pour former du 3,5-DCQ et du caféoyl-CoA (Lallemand *et al*., 2012).

Une deuxième étude mentionne le rôle de l'HQT dans la synthèse des acides dicaféoyl-quiniques (1,5-, 3,5- et 4,5-DCQ) chez la tomate. Les chercheurs ont utilisé une méthode qui consiste à identifier le gène à partir d'une activité enzymatique détectée. Cette activité dénommée « chlorogénate : chlorogénate transférase (CCT) », catalyse la conversion de l'acide chlorogénique en acides dicaféoyl-quiniques (1,5-, 3,5- et 4,5-DCQ). La séquence peptidique isolée de la fraction portant l'activité CCT a été analysée par des approches de bioinformatique et correspond au gène codant une HQT. L'expression de la protéine recombinante SlHQT chez *E. coli* montre que l'enzyme catalyse *in vitro* la synthèse des acides dicaféoyl-quiniques en présence de fortes quantités d'acide chlorogénique (Moglia *et al*., 2014). Chez l'artichaut, l'HQT peut être codée par deux gènes distincts et les deux isoformes de HQT contribuent à la synthèse de CGA mais leur fonction peut s'étendre à d'autres voies de biosynthèse comme c'est le cas de l'HQT 1 impliquée dans la synthèse de 1,3-DCQ (Sullivan, 2009; Sonnante *et al*., 2010).

2.5.7.5.2.3 L'expression spatio-temporelle des HCT et HQT

Si l'on s'intéresse à l'expression tissulaire de l'HCT, une étude d'immuno-localisation a révélé son expression dans les tissus vasculaires du tabac (Hoffmann *et al*., 2004).

Pour aller plus loin, la localisation subcellulaire a été étudiée sur l'HQT de tomate. L'ADNc de *SlHQT*, fusionné à des séquences codant des protéines fluorescentes, a été introduit par bombardement dans des tissus épidermiques d'oignon. Ces tissus ont l'avantage d'être dépourvus de chloroplastes susceptibles d'interférer avec la fluorescence. La fluorescence a été détectée dans le cytoplasme et plus tardivement (96h après incubation) dans la vacuole. La vacuole est un compartiment acide et contient de grandes quantités d'acide chlorogénique, car elle constitue un lieu de stockage. La double localisation de cette enzyme peut s'expliquer par le fait qu'elle peut effectuer des fonctions différentes selon le compartiment cellulaire où elle se trouve. Comme précédemment évoqué, l'HQT est capable de réaliser la synthèse d'acide chlorogénique et d'acides dicaféoyl-quiniques. L'hypothèse attendue est que l'HQT catalyse la synthèse d'acide chlorogénique dans le cytoplasme. Lorsque le CGA est synthétisé dans le cytoplasme en quantités suffisantes, celui-ci est transporté dans la vacuole, où il sera utilisé par l'HQT pour conduire à la synthèse de DCQs (Moglia *et al*., 2014).

L'expression de l'HCT dépend non seulement de sa localisation mais aussi de l'âge du tissu où sont accumulés les esters caféoyl-quiniques. Chez le café, le niveau transcriptionnel du gène codant l'HCT et l'accumulation d'acide chlorogénique varient en fonction du stade de développement de la graine de café (Joet *et al*., 2010). Chez la tomate, il a été observé que la quantité de DCQ et l'expression des gènes homologues codant l'HQT augmentent au cours de la maturité et atteignent leur maximum dans les fruits mûrs (Moglia *et al*., 2014).

2.5.7.5.2.4 Etude structurale et identification des sites catalytiques pour la synthèse des acides mono- et di-caféoyl-quiniques

L'analyse de la structure tridimensionnelle de l'HCT de café sous sa forme cristallisée a permis d'identifier des résidus importants impliqués dans la spécificité du substrat et l'activité catalytique (Lallemand *et al*., 2012). Des approches de mutagénèse dirigée soulignent le rôle de plusieurs acides aminés. Le résidu His-153, situé dans la région fortement conservée HXXXD commune aux BAHD, fait partie du site actif de l'HCT de café et est essentiel à l'activité de synthèse de 3,5-DCQ. Le pH peut avoir une influence sur ce résidu et ainsi affecter l'activité de l'HCT. Le résidu His-154 est également très conservé chez l'HCT tandis qu'il est très variable chez les HQT. Un autre acide aminé du site catalytique a été identifié. Il s'agit du résidu His-35 important pour la synthèse de 5-CGA. La conformation de la boucle entre Val-31 et Pro-37 joue un rôle important dans la conformation de la chaîne latérale du site catalytique. D'autres résidus sont importants dans la spécificité du substrat comme les acides aminés Leu-400 et Phe-402. Trois sites de liaison du substrat (SBP) situés à l'extrémité C-terminale de la protéine ont été identifiés à proximité du site catalytique. Le site accepteur d'acyle SBP1

interagit avec le coenzyme A. Les deux autres sites interagissent avec le noyau hydroxycinnamoyl au niveau de l'acide quinique en position 3 pour SBP 2 et en position 5 pour SBP3 (Lallemand *et al*., 2012).

Comparé à l'HCT, l'HQT présente des sites catalytiques différents comme il a été montré par l'analyse prédictive de la structure tridimensionnelle de l'HQT de tomate. Basés sur les mêmes approches que précédemment, les résultats indiquent que la présence de l'histidine en position 276 (His-276) est essentielle à l'activité de synthèse des DCQs. Ce résidu participe au site catalytique et permet l'interaction avec le noyau quinate de l'acide chlorogénique utilisé comme donneur d'acyle. De façon intéressante, l'HQT d'artichaut, qui a un résidu tyrosine à la place de l'histidine, a une très faible activité. Cela suggère que la capacité à assurer la production de DCQs peut être limitée aux enzymes HQT chez les Solanacées à cause de la présence de ce résidu (Moglia *et al*., 2014).

L'alignement des séquences de ces enzymes issues des Solanacées, de l'artichaut et du café montre que le résidu Tyr-296 est commun à toutes les HCT et HQT à l'exception de l'HQT de tomate dont le résidu équivalent est le His-276. Il est intéressant de noter la ressemblance de cette activité HQT avec celle observée dans les travaux de Villegas *et al*., 1987. Cette étude a précédemment montré qu'une activité enzymatique peut utiliser l'acide chlorogénique comme donneur et accepteur d'acyle dans les extraits racinaires de patate douce, laissant supposer qu'il y ait un lien entre ces deux enzymes (Moglia *et al*., 2014).

2.5.7.5.2.5 Les autres rôles et le lien avec la synthèse de lignine

D'autres combinaisons de substrats peuvent être utilisées par les HCT et HQT selon leur affinité pour certains composés. L'HCT, parfois référencée sous l'abréviation HST (Sander et Petersen, 2011), montre une préférence pour le shikimate et participe indirectement à la synthèse de lignine selon différentes voies : soit en conduisant à la synthèse de l'acide 5-*O*-caféoyl-shikimique (Wagner *et al*., 2007; Sander et Petersen, 2011), soit par conversion du 4-coumaroyl-CoA en 4-coumaroyl shikimate (Schoch *et al*., 2001; Hoffmann *et al*., 2005; Walker *et al*., 2013), ces produits étant des précurseurs à la synthèse des monolignols composant la lignine. Le même rôle a été démontré chez *Pinus radiata* par des approches de répression et de surexpression du gène, soulignant l'importance de l'HCT dans la synthèse des unités guaiacyl et syringyl composant la lignine, ce qui constitue une caractéristique commune aux angiospermes et gymnospermes (Wagner *et al*., 2007).

Par ailleurs, il a été clairement démontré que les réactions catalysées par ces enzymes sont réversibles (Hoffmann *et al*., 2003, 2005 ; Lee *et al*., 2011; Lallemand *et al*., 2012). Ainsi, l'HCT peut réaliser la réaction inverse de la synthèse d'acide chlorogénique, c'est-à-dire la transformation du caféoyl-quinate en caféoyl-CoA (Figure 13) (Niggeweg *et al*., 2004; Comino *et al*., 2007). Ce dernier est utilisé par la 5-hydroxy-férulique/caféique-*O*-méthyl transférase

(COMT) pour produire du féruloyl-CoA intervenant dans la synthèse de lignine et de subérine essentielles au développement du tubercule de la pomme de terre (Valiñas *et al*., 2015).

Notons qu'il existe un lien entre la synthèse d'acide chlorogénique et la synthèse de lignine *via* l'HCT. En effet, la répression *in planta* du gène codant l'HCT de tabac et celle d'*Arabidopsis thaliana* entraîne une accumulation de 5-CGA dans les tissus vasculaires. Cette répression a également des répercussions sur la composition de la lignine qui se traduit par un phénotype de nanisme de la plante. D'après ces observations, il semble que le rôle de l'HCT soit plutôt attribué à la remobilisation du 5-CGA pour la synthèse de la lignine chez les plantes vasculaires (Hoffmann *et al*., 2004). Ces résultats se confirment dans une étude menée chez le café par analyse de l'expression des gènes (qPCR) au cours du développement des graines. L'expression de l'HCT augmente dans les tissus lignifiés et est corrélée à la synthèse de CGA, soulignant son rôle dans la synthèse de la lignine et dans l'accumulation du CGA (Lepelley *et al*., 2007).

Si les HCT et les HQT peuvent jouer des rôles différents entre les espèces végétales, plusieurs isoformes peuvent coexister au sein d'une même espèce avec des fonctions distinctes (Chen *et al*., 2015). Chez le trèfle violet, on trouve deux isoformes de HCT. Les deux séquences ne partagent que 34% d'identité d'acides aminés et des différences sont notées au niveau de leur rôle. L'HCT1 catalyse la trans-estérification entre un caféoyl-CoA ou un *p*-coumaroyl-CoA vers un shikimate tandis que l'HCT2 transfère le groupement caféoyl sur l'acide malique pour former le caféoyl-malate (acide phasélique) (Sullivan, 2009). Celle-ci peut également jouer un rôle dans la synthèse d'esters d'hydroxycinnamoyl-malate (Sullivan et Zarnowski, 2011). Comme évoqué dans le δ 2.5.7.5.2.2, deux HQT sont présentes chez la tomate, dont l'une (HQT1) intervient dans la synthèse de 1,3-DCQ (Sonnante *et al*., 2010).

Un autre exemple d'isoforme, rencontrée chez *Populus nigra*, est l'HCT1 impliquée dans la conversion du *p*-coumaroyl-CoA en *p*-coumaroyl-shikimate, en étroit lien avec la synthèse de lignine, mais les autres isoformes potentielles n'ont pas été décrites (Vanholme *et al*., 2013).

Pour résumer, les HCT et HQT peuvent accepter un large panel de substrats donneurs d'acyle, à savoir le *p*-coumaroyl-CoA, le caféoyl-CoA et le féruloyl-CoA, et se distinguent en fonction de leur affinité pour le substrat accepteur (Lallemand *et al*., 2012). Les HCT ont une préférence pour le shikimate chez les Solanacées. La spécificité du substrat peut varier en fonction de l'espèce végétale mais également par rapport aux isoenzymes présentes dans la même espèce.

Ces enzymes partagent au moins 64% d'identité de séquence peptidique et concourent aux mêmes rôles dans la biosynthèse de CGA et plus indirectement dans la synthèse de lignine. L'HCT semble jouer un rôle dans la synthèse d'acide chlorogénique en lien avec la synthèse de lignine chez les plantes vasculaires. Par contraste, les HQT homologues sont étroitement associées aux plantes accumulatrices d'acide chlorogénique comme le café, l'artichaut, la tomate et le tabac.

En plus des rôles évoqués précédemment, ces deux enzymes sont impliquées dans la synthèse des acides dicaféoyl-quiniques selon la plante concernée, qui peut être soit une HQT chez la tomate, soit une HCT chez le café. La multifonctionnalité de ces enzymes peut varier en fonction de leur localisation tissulaire et subcellulaire. Si l'on regarde la séquence peptidique, le résidu H276 spécifique à l'HQT de tomate est essentiel à l'activité de synthèse des acides dicaféoyl-quiniques. Par ailleurs, les HCT et HQT qui n'ont pas le résidu H276 peuvent utiliser d'autres mécanismes pour synthétiser du DCQ. Il est possible que des voies alternatives puissent s'être développées au cours de l'évolution des différentes familles de plante (Sullivan, 2009). Bien que ces avancées aient permis de comprendre la voie de synthèse des DCQs chez le café et la tomate, cette voie de biosynthèse reste encore à élucider chez d'autres espèces végétales qui en accumulent en grande quantité comme la patate douce.

3 *Ipomoea batatas* L (patate douce)

3.1 Description botanique

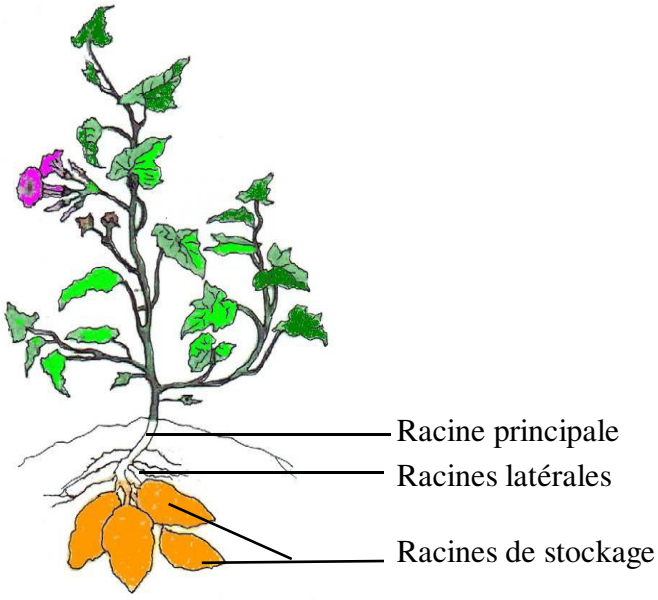


Figure 16 : Représentation schématique de la plante Ipomoea batatas L. Source : International Potato Center (CIP), Agricultural Research for Development (ARD). www.cipotato.org.

Ipomoea batatas, connue sous le nom commun de « patate douce », est une plante dicotylédone de la famille des Convolvulacées. L'ipomée est le nom générique qui regroupe l'ensemble des espèces du genre *Ipomoea*.

C'est une plante vivace herbacée et rampante à croissance pérenne. Ses tiges longues et fines s'étendent sur le sol. Contrairement à la pomme de terre, la patate douce a des racines de

stockage (ou racines tubéreuses) décrites comme des racines latérales et élargies, et non pas des tubercules. Les racines ont une croissance rapide et en se propageant, forment de nouvelles racines de stockage. Chaque plant produit quelques racines de stockage sur le site de plantation (10 environ), pesant entre 0,1 et 1 kg (Figure 16).

Il existe un grand nombre de variétés dont la chair des racines de stockage peut être blanche, orange ou violette (Figure 17). La chair orange vient du β-carotène qu'elle contient et la couleur violette provient de sa richesse en anthocyanes.



Figure 17 : Les différentes variétés de patate douce à chair violette, blanche et orange. Source: International Potato Center (CIP).

3.2 Conditions de culture

La patate douce est facile à cultiver et est peu exigeante en termes de conditions de culture. Sa température optimale de croissance est entre 21°C et 26°C et est bien adaptée à la chaleur et à la sécheresse. Elle peut se développer sur des sols très pauvres et peut même être cultivée à des altitudes pouvant atteindre 2500 mètres. Il a également été démontré que ces plantes sont plus tolérantes à des maladies, des ravageurs et à l'humidité élevée comparé à d'autres légumes-feuilles cultivés dans les régions tropicales (Nedunchezhiyan *et al*., 2012). Cette plante se développe mieux sur des sols acides (pH optimum 5,5-6,5) et préfère une exposition ensoleillée. La patate douce est cultivée par propagation végétative, en réalisant des boutures à partir des tiges (source : International Potato Center ; CIP).

L'ipomée est également un des rares légumes qui peut être cultivé facilement pendant les saisons de mousson. Les feuilles de cette plante sont parmi les seules légumes verts disponibles dans certains pays après une inondation ou un typhon (Islam *et al*., 2003; Loebenstein et Thottappilly 2009).

3.3 Distribution géographique et production

La patate douce est une plante originaire du Yucatan au Mexique et de Honduras et fut découverte à l'époque de Christophe Colomb. Depuis, sa culture s'est étendue dans les régions tropicales et sous-tropicales (Chine, Etats-Unis, Inde, Japon, etc…).

Elle est actuellement classée au 5ème rang mondial parmi les plus grandes cultures agronomiques comme le maïs et le blé. Selon les statistiques de la FAO, la production mondiale s'élevait en 2013 à 110 millions de tonnes (http://faostat3.fao.org/) dont la Chine est le leader mondial avec 80% de cette production (Source : AgMRC ; www.agmrc.org et www.cipotato.org).

Son rendement de productivité dépasse de loin celui des autres cultures, avec un taux de 22 kg/ha/jour en termes de matières sèches contre 18 pour le riz et la pomme de terre (www.fao.org).

3.4 Valeurs nutritionnelles et propriétés médicinales

Parallèlement à ses caractéristiques culturales, cette plante a également attiré l'attention en raison de ses qualités nutritionnelles et de ses propriétés thérapeutiques.

La patate douce est une plante entièrement comestible. On peut aussi bien consommer les feuilles que les racines (Padmaja, 2009).

Les feuilles, qui sont consommées comme un légume frais, ont l'avantage d'être récoltées plusieurs fois par an. De fait, leur production annuelle est beaucoup plus importante que celle d'autres légumes verts. Elles sont riches en vitamine B, fer, calcium, zinc et protéines (Guan *et al*., 2006).



Figure 18 : Teneurs en macronutriments et valeur énergétique de la patate douce pour 100g de matière fraîche. Source : International Potato Center (CIP).

Les racines tubéreuses présentent un apport énergétique de 76 kcal/ha/jour contre 50 pour le riz et la pomme de terre (source : FAO) (Figure 18). C'est l'un des produits alimentaires cibles pour la production d'ingrédients à haute valeur nutritive et pour ses apports bénéfiques sur la

santé humaine. Les composés actifs (rutine, acide chlorogénique, quercétine, acide caféique, et vitamine C) sont concentrés particulièrement dans la peau de la patate douce.

Plusieurs études montrent que les acides phénoliques et les anthocyanes contribuent à l'activité antioxydante dans les racines de patate douce (Oki *et al*., 2002; Rumbaoa *et al*., 2009). En effet, la corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux est très élevée dans les feuilles, ce qui indique que les polyphénols sont des antioxydants importants (Sun *et al*., 2014). Les acides caféoyl-quiniques contribuent également à l'activité antioxydante (Bellail, 2012). Les variétés à chair orange sont une source de β-carotène avec des concentrations jusqu'à 20mg/100g de matière fraîche. Les anthocyanes, responsables de la pigmentation dans la chair violette de la patate douce, ont des activités antioxydantes très fortes et font l'objet d'études pour des traitements préventifs contre le cancer colorectal (Lim *et al*., 2013). Pour toutes ces raisons, l'ipomée fait partie des plantes choisies par la NASA pour effectuer des études de culture en milieu contrôlé et a été choisie comme une des plantes qui pourrait être une source primaire de nourriture dans le cadre de projets de colonisation spatiale (Islam *et al*., 2003).

3.5 Une grande richesse en acides caféoyl-quiniques

La patate douce est une plante connue pour sa forte résistance aux bactéries, aux champignons, aux insectes et aux parasites. Cette robustesse est étroitement reliée à sa richesse en composés phénoliques, en particulier les acides caféoyl-quiniques et dérivés (Duke *et al*., 2003). En effet, des études phytochimiques mettent en évidence une forte teneur en polyphénols et notamment en acide caféique et en dérivés d'acide caféoyl-quinique plus ou moins complexes.

La patate douce contient un large panel d'acides caféoyl-quiniques dominés par l'acide chlorogénique, les acides 3,5- et 4,5-dicaféoyl-quiniques. Le profil biochimique, la distribution tissulaire et la teneur en acides caféoyl-quiniques peuvent varier selon l'origine géographique (Zheng et Clifford, 2008). Par exemple, le 3,4,5-TCQ présent dans les feuilles des variétés du Japon n'est pas détecté dans celles provenant de Chine et des Etats-Unis. Les acides caféoyl-quiniques sont peu présents dans les racines des variétés de Chine et absents dans les feuilles des variétés du Japon (Truong *et al*., 2007).

Les teneurs en acides phénoliques varient considérablement selon les variétés (Padda et Picha, 2008). Par exemple, la teneur en 3,5-DCQ varie de 0,9 à 3% de matière sèche dans les feuilles entre les différentes variétés du Japon (Islam *et al*., 2002).

La plus forte teneur en dérivés d'acide caféoyl-quinique est mesurée dans les feuilles (de 1,42 à 17,1g/100g de matière sèche) où sont présents la majeure partie des différents composés (Figure 19) (Islam *et al*., 2002). L'analyse biochimique de 14 variétés commerciales provenant d'Europe et des Etats-Unis révèle que le 3,5-DCQ prédomine dans les feuilles, suivi de l'acide chlorogénique (Padda et Picha, 2008). Les formes majoritaires d'acide chlorogénique sont le 3-

et le 5-CGA. On détecte également en moindre quantité la forme 3,4,5-TCQ dont la teneur peut aller jusqu'à 1% de matière sèche dans les feuilles selon la variété (Islam *et al*., 2002).

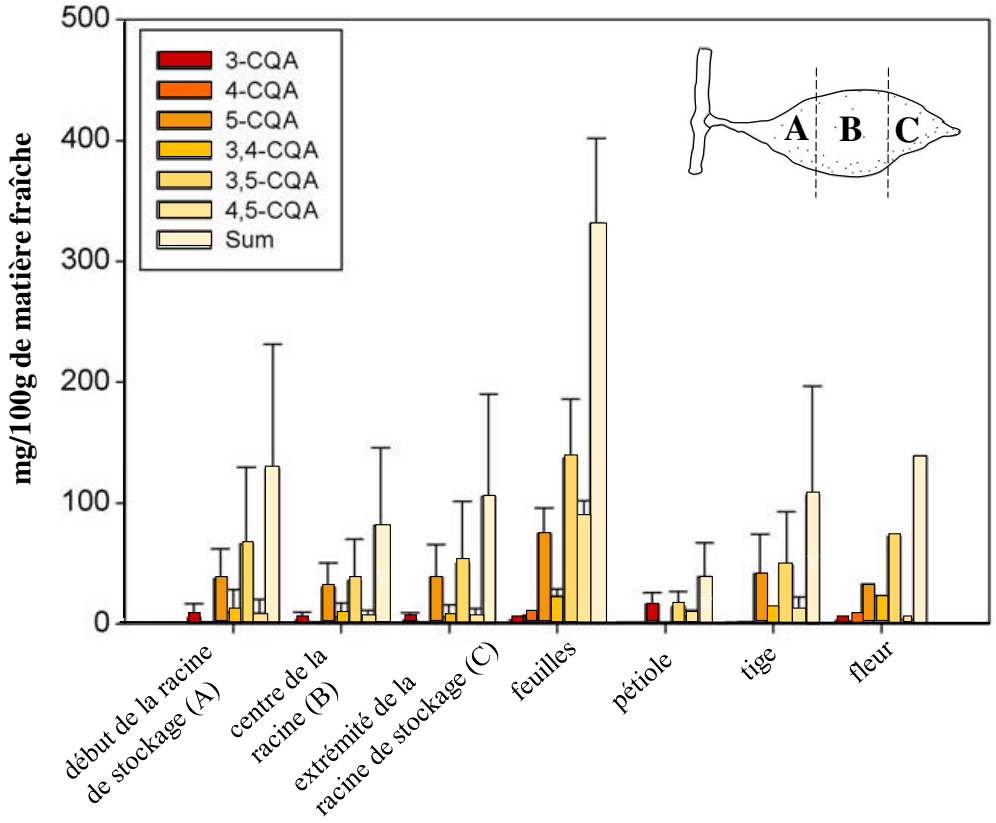


Figure 19 : Distribution des acides caféoyl-quiniques et dérivés dans les différentes parties de la plante Ipomoea batatas ; Jung et al, 2011.

Dans les racines, les teneurs en dérivés d'acide caféoyl-quinique sont variables entre les variétés à chair blanche, orange et violette. La molécule majoritaire dans les racines peut être soit l'acide chlorogénique (5-CGA) soit le 3,5-DCQ selon la variété et l'acide caféique est le moins abondant (Truong *et al*., 2007).

Une étude a montré que toutes les variétés à chair violette ont la même activité antioxydante et la meilleure teneur en composés phénoliques totaux. La plus forte teneur en acide chlorogénique est trouvée chez une variété à chair blanche, tandis que la plus forte teneur en 3,5-DCQ est trouvée dans une variété à chair violette (50mg/100g de matière sèche). Celles à chair orange ont des teneurs variables en CGA et DCQ (Padda et Picha, 2008). Parmi elles, la variété « Beauregard » est l'une des plus étudiées et l'une des plus riches en 3,5-DCQ avec une teneur d'environ 3mg/100g de matière sèche dans les racines (Bellail, 2012). Les auteurs Padda et Picha ont montré que les petites racines de stockage de cette variété (diamètre de 1,2cm) ont des teneurs en acides caféoyl-quiniques plus fortes que dans les racines plus larges (Padda et Picha, 2008).

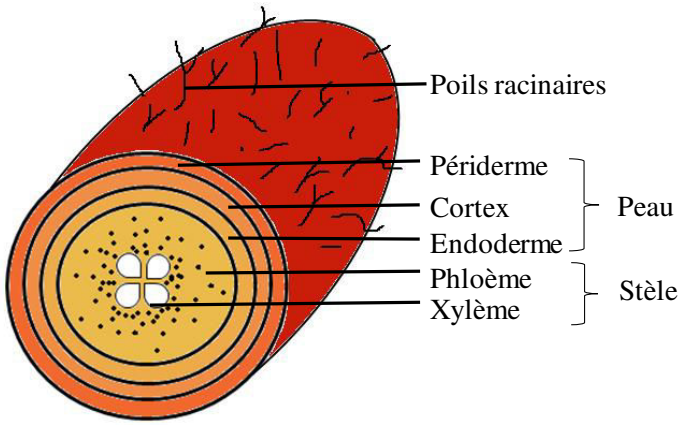


Figure 20 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'une racine de stockage de patate douce.

Une analyse des racines indique qu'approximativement 78% des acides caféoyl-quiniques sont trouvés dans la peau et jusqu'à 5mm de profondeur de la racine de stockage (Son *et al.*, 1991). L'acide chlorogénique et le 3,5-DCQ sont localisés dans le périderme et la stèle et sont particulièrement concentrés dans le cortex à des taux similaires (Figure 20). Le 3,5-DCQ a une teneur plus forte que l'acide chlorogénique dans le périderme. Le 3,5-DCQ représente 80% de la teneur en acides dicaféoyl-quiniques totaux dans la racine (Harrison *et al.*, 2001, 2008).

Des chercheurs ont mis au point un système de culture cellulaire à partir de racines de stockage de patate douce pour la production d'acide chlorogénique, de 3,4-, 3,5- et 4,5-DCQ ainsi que de 3,4,5-TCQ. Le composé majeur produit par les cellules était le 3,5-DCQ pouvant atteindre un niveau d'accumulation de 80mg/100g de matière fraîche (Konczak *et al.*, 2004, 2005).

OBJECTIFS DE LA THESE

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un contrat CIFRE financé par l'entreprise Plant Advanced Technologies, située à Vandœuvre-lès-Nancy, et en collaboration avec l'UMR1121 Université de Lorraine/INRA Laboratoire Agronomie et Environnement (LAE).

La société PAT produit des extraits racinaires d'ipomée par la technologie dite des ″Plantes à Traire®˝avec une teneur moyenne en 3,5-DCQ de 1g/L. Cette molécule fait l'objet d'un contrat de production avec CHANEL notamment pour la confection de crèmes anti-rides. Les niveaux de production peuvent parfois varier en fonction des conditions de culture et la production ne peut être maintenue en continu toute l'année due aux changements de saison.

En parallèle de la technologie Plantes à Traire®, l'entreprise souhaite développer de nouvelles plateformes de production de molécules d'intérêt en élaborant des outils d'ingénierie métabolique ou de biologie de synthèse. Les molécules dérivées des acides caféoyl-quiniques constituent une des familles de molécules cibles. Pour produire ces molécules à l'échelle industrielle, une stratégie consiste dans un premier temps à isoler les gènes impliqués dans leur voie de biosynthèse chez l'ipomée. Dans un second temps, ces gènes pourront être utilisés pour stimuler la production de DCQ chez la plante par des approches de génie génétique, ou alors pour produire directement ces molécules dans des systèmes hétérologues comme des micro-organismes.

Pour comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la synthèse de ces molécules, des travaux ont été initiés au LAE en 2006 au travers d'une collaboration avec l'Université de Turin. Ces travaux ont, jusque-là, permis de caractériser un certain nombre d'étapes clés de la voie de biosynthèse chez l'artichaut et ont été valorisés par deux publications (Comino *et al*., 2007, 2009). En 2011, le LAE a initié une collaboration avec la société PAT pour identifier les gènes candidats impliqués dans la synthèse des dérivés d'acide caféoyl-quinique chez *Ipomoea batatas*, la patate douce. Ce projet a permis la construction d'une banque RNAseq basée sur des ARNs extraits de racines d'ipomée surproduisant du 3,5-DCQ. Une analyse de cette banque a mené à l'identification d'une dizaine de séquences codant des acyltransférases correspondant à des candidats potentiellement impliqués dans la synthèse de la molécule d'intérêt.

Dans le cadre de mon travail de thèse, j'ai été amenée à réaliser des choix entre ces différents gènes afin d'identifier et de caractériser celui qui pourrait jouer un rôle dans la synthèse de DCQ. Ce travail a été réalisé en trois étapes.

La première étape a reposé sur une approche de qPCR différentielle couplée à une analyse phytochimique. Une recherche de corrélation entre l'expression des gènes candidats et la production de DCQ dans des racines d'ipomée a permis de faire un tri parmi les différents candidats identifiés dans la banque RNAseq.

La seconde étape a consisté à réaliser la caractérisation fonctionnelle des gènes candidats en exprimant les protéines correspondantes dans un système d'expression hétérologue bactérien et en réalisant des tests enzymatiques *in vitro*.

La troisième étape m'a amenée à étudier la fonction de l'enzyme dans la plante en introduisant le gène dans le génome du tabac, une plante ne produisant pas ou peu de DCQ. Ces plantes transgéniques ont également été testées pour leur résistance à des maladies fongiques.

MATERIEL ET METHODES

1 Le matériel biologique

1.1 Le matériel végétal

1.1.1 *Nicotiana tabacum* var Samsung

Les graines de *Nicotiana tabacum var* Samsung ont été fournies par l'INRA de Colmar (Dr Philippe Hugueney, Laboratoire de Génétique et d'Amélioration de la Vigne, UMR1131, INRA, Université Louis Pasteur Strasbourg). Elles ont été mises en germination en condition *in vitro*.

1.1.2 *Ipomoea batatas*

1.1.2.1 La variété

La variété a été fournie par la société d'horticulture DELACOUR. Cette variété a été multipliée par bouturage chez PAT.

1.1.2.2 La culture des plantes en serre

- Les milieux de culture

	N (azote)	P (phosphore)	K (potassium)	Ref fournisseur (Plantprod)
Condition « contrôle »	15	10	30	11345201
Condition « azote limitant »	0	15	40	16250801

Tableau 7 : Composition des engrais N.P.K dans les milieux de culture des ipomées. N : azote ; P : phosphore ; K : potassium.

Les mêmes conditions de culture que celles utilisées chez PAT ont été utilisées. Les milieux de culture renferment des engrais fertilisants conventionnels commercialisés sous forme de poudre fabriquée par Plantprod (Tableau 7). Ce milieu contient des éléments nutritifs qui sont l'azote, le phosphate et le potassium (N, P, K) présents à l'état pur. Ces minéraux sont solubilisés dans l'eau pour être bio-disponibles pour la plante. Ces milieux peuvent être de composition variable

selon le rapport N.P.K. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé deux modalités de milieu : une modalité « contrôle » composée des 3 éléments minéraux (ratio N/P/K : 15-10-30) et une condition « azote limitant » dont l'engrais ajouté dans le milieu est dépourvu d'azote (ratio N/P/K : 0-15-40). Le ratio N.P.K de ces deux engrais est indiqué dans le Tableau 7. Les solutions nutritives sont préparées par dissolution des engrais dans l'eau du robinet et la teneur en électrolytes est ajustée à une électroconductivité de 1,2 $mS.cm^{-1}$ final.

- Les systèmes aéroponiques

Il s'agit d'une technique qui découle de l'évolution de la culture hydroponique. Les parties aériennes poussent à l'air libre sous serre et les racines sont confinées dans un circuit fermé où l'irrigation est assurée par la brumisation de la solution nutritive. Deux boutures de plante sont mises dans des pots ajourés remplis de billes d'argile. Les pots sont transférés sur des plaques Barthélémy placées sur le système aéroponique (d'une surface de $1,96m^2$) pouvant loger 32 pots. Les plaques sont disposées sur un container fermé à l'intérieur duquel le milieu est diffusé par des buses d'aspersion. Le système est connecté à une pompe contrôlée par un programmateur pour régler le cycle d'arrosage. La durée d'aspersion est de 30 secondes suivie d'un temps d'arrêt de 3 minutes. Le bac de milieu nutritif est rempli de 40L de milieu dont l'électroconductivité est ajustée à 1,2mS en rajoutant de l'engrais en poudre (N/P/K : 0.15.40 pour la modalité sans azote et 15.10.30 pour la modalité avec azote) ou en diluant à l'eau tous les 2 jours avec un électroconductimètre.

1.1.3 Le prélèvement des tissus

Pour *Ipomoea batatas*, les prélèvements sont réalisés aléatoirement sur trois racines coupées longitudinalement. Les tissus sont broyés à l'azote liquide et la poudre est divisée en deux parties. Une partie a été réservée pour réaliser les extractions d'ARN (δ 4.1.1) et l'autre partie pour la préparation d'extraits hydro-éthanoliques servant aux analyses phytochimiques (δ 7.4.2). Pour les tabacs transgéniques cultivés *in vitro*, nous avons prélevé en condition stérile des jeunes feuilles d'environ 2 cm de largeur et 4 cm de longueur avec le pétiole. Les tissus sont congelés immédiatement dans l'azote liquide et placés à -80°C.

1.2 Les souches bactériennes

1.2.1 *Escherichia coli*

1.2.1.1 Les souches d'*Escherichia coli* utilisées pour le clonage des gènes d'intérêt

1.2.1.1.1 La souche Genehogs®

La souche Genehogs® est commercialisée par Invitrogen™ (ThermofisherScientific, Waltham, Massachusetts, USA). Cette souche dérive des bactéries *E. coli* DH10B et a été spécialement conçue pour cloner des fragments d'ADN de grande taille. Elle a pour génotype : *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA::IS2*.

1.2.1.1.2 La souche MC 1022

Cette souche, développée par un laboratoire américain (Casadaban et Cohen, 1980), est utilisée pour le clonage de vecteurs de grande taille (d'environ 14kb). Dérivée de la souche K12 d'*Escherichia coli,* son génotype est le suivant : *araD139 (ara leu)7697 Δ(lacZ)M15 galU galK strA*.

1.2.1.2 Les souches utilisées pour l'expression des protéines recombinantes

1.2.1.2.1 Les souches BL21 (DE3) et Rosetta™ 2

Dérivée de la souche *E. coli* B, la souche BL21 (DE3) (Novagen) a été optimisée pour l'expression des protéines recombinantes. Son génome renferme une région contenant le gène *lacI*, le promoteur *lacUV5* et le gène codant l'ARN polymérase T7. Son génome est naturellement dépourvu des protéases OmpT et Lon, ce qui conduit à une production des protéines recombinantes intactes avec des hauts rendements. Le suffixe « DE3 » indique que l'hôte est un lysogène de DE3, portant une copie chromosomique du gène codant la T7 RNA polymérase sous le contrôle du promoteur inductible *lacUV5*. Cette souche est utilisée pour produire des protéines recombinantes après induction du promoteur T7 par l'IPTG.

L'autre souche utilisée est Rosetta™ 2 (Novagen) qui est une souche BL21(DE3) modifiée pour faciliter l'expression des protéines eucaryotes. Elle contient un plasmide qui porte le gène codant les ARN-t requis pour la traduction des codons rarement présents chez les procaryotes. Ce plasmide confère la résistance au chloramphénicol. Elle est caractérisée par le génotype suivant : F^- *ompT hsd*S_B (r_B^- m_B^-) *gal dcm* pRARE2 (Cam^R).

1.2.1.2.2 La souche M15 [pRP4]

Cette souche est commercialisée par Qiagen. Elle contient dans son génome un plasmide pREP4 qui confère la résistance à la kanamycine et qui exprime constitutivement le répresseur *lac* empêchant l'expression basale de la protéine d'intérêt. Elle convient au clonage des systèmes plasmidiques de type pQE sous le contrôle du promoteur T5.

1.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pour la transformation de *Nicotiana tabacum*. Son plasmide de virulence (pAL4404) contient le gène de résistance à la streptomycine. L'Agrobactérie porte également un gène de résistance à la rifampicine (Rif^R) sur son chromosome.

1.3 Les souches fongiques

Les souches fongiques ont été fournies par la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain (MUCL/BCCM, Belgique). Ces espèces fongiques ont été choisies d'une part parce qu'elles sont peu exigeantes à cultiver et d'autres parts parce qu'elles sont décrites comme étant sensibles à des dérivés d'acide chlorogénique (Dan *et al*., 2010; Chen *et al*., 2013).

1.3.1 *Botrytis cinerea*

Pour les tests d'infection fongique, nous avons utilisé la souche MUCL 43837 de *Botrytis cinerea* aggr. Ce phytopathogène est classé parmi les Ascomycètes. Il est polyphage, c'est-à-dire qu'il ne présente pas de spécificité d'hôte. Il peut attaquer de nombreuses espèces végétales, y compris la tomate et le tabac (Swartzberg *et al*., 2008). Pour le cultiver *in vitro*, ce champignon se développe sur un milieu PDA à 25°C et à l'obscurité.

1.3.2 *Phytophthora parasitica*

Les tests d'infection fongique ont été effectués avec la souche de *Phytophthora parasitica* Dastur MUCL 41915 (collection CCMM/INRA P196) originaire du Maroc. C'est un Oomycète responsable de nombreuses maladies dévastatrices en agriculture. Ce parasite est capable d'infecter un large spectre de plantes hôtes en particulier les Solanacées comme le tabac, la tomate et la pomme de terre (Benson, 1997; Attard *et al*., 2008; Meng *et al*., 2014). C'est un micro-organisme biotrophe, c'est-à-dire qu'il a besoin d'un tissu vivant pour acquérir les

nutriments nécessaires à sa croissance (Chang *et al*., 2015). En laboratoire, ce champignon se cultive sur un milieu V8 à 25°C.

1.4 Les plasmides

1.4.1 Le plasmide TA pCR™8

Le kit « pCR™8 /GW/ TOPO® TA Cloning » est commercialisé par Invitrogen™. Cette appellation sera simplifiée par le terme « pCR8 ». C'est un plasmide à haut niveau de copies de 2817pb. Son système TOPO® permet de cloner en 5 minutes le produit PCR et est accessible au séquençage. Le vecteur se présente sous forme linéaire, avec un nucléotide 3'-thymidine (T) à chaque extrémité. La topoisomérase I est liée de façon covalente au niveau des sites CCCTT et catalyse la ligation du produit PCR entre les deux sites (Figure 21).

Ce vecteur bénéficie de la technologie Gateway® (GW), ce qui permet de transférer le gène d'intérêt vers un vecteur de type Gateway par recombinaison sur des sites spécifiques.

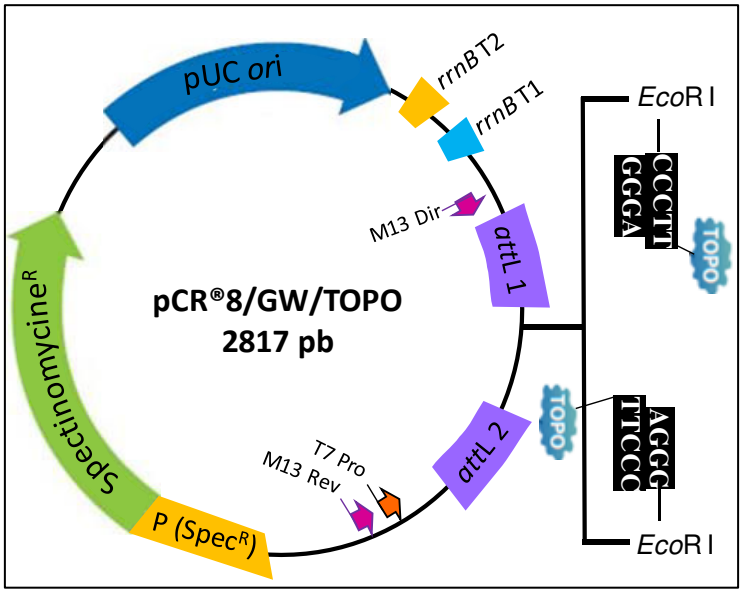


Figure 21 : Représentation schématique du plasmide pCR8/GW/TOPO. Taille : 1817 pb. attL 1 et 2 : sites de recombinaison Gateway®. rrnB T1 et T2 : sites de terminaison de la transcription. P(Spec^R) : promoteur du gène de résistance à la spectinomycine. M13 Dir et Rev : sites d'aide au séquençage de l'insert. T7 pro : promoteur T7. pUC ori : origine de réplication du plasmide. TOPO : TOPO isomérase.

Ce plasmide comporte plusieurs éléments (Figure 21) :

- L'origine de réplication pUC (*ori*) permet la réplication du plasmide à hautes copies et son maintien dans la bactérie.

- Les sites de terminaison de la transcription *rrn*B T1 et T2 réduisent la toxicité potentielle dans *E. coli* de l'expression basale du produit de PCR.
- Le promoteur T7 est reconnu par l'ARN polymérase et participe à la transcription *in vitro*. Cette séquence peut s'hybrider à des amorces universelles qui aident au séquençage de l'insert.
- Les sites universels M13 Dir et M13 Rev ne sont pas utilisés pour le clonage, mais aident au séquençage pour vérifier la séquence du fragment d'intérêt.
- Les sites *att*L1 et *att*L2 sont reconnus par des clonases qui réalisent des recombinaisons entre le plasmide donneur et le plasmide receveur de type Gateway®, permettant le transfert du gène d'intérêt.
- La cassette « TOPO® cloning » est le site d'insertion du produit PCR. Les deux sites de restriction *Eco*RI encadrant le site de clonage permettent une excision simple de l'insert pour vérifier la présence de l'insert recombiné par digestion enzymatique.
- Le promoteur du gène de résistance à la spectinomycine permet d'activer l'expression du gène.
- Le gène de résistance à la spectinomycine (*aad*A1) permet de sélectionner les bactéries ayant reçu le plasmide.

1.4.2 Les plasmides d'expression des protéines recombinantes

1.4.2.1 Le plasmide pET28b

Le plasmide pET28b provient de chez Novagen®. Le système pET est conçu pour le clonage et l'expression des protéines recombinantes chez *E. coli*. Ce plasmide d'expression est équipé d'un promoteur T7 contrôlant l'expression du gène d'intérêt uniquement en présence de l'ARN T7 polymérase (dérivant du bactériophage T7) dans la cellule hôte. Cette enzyme dont le gène est placé sous le contrôle du promoteur *lacUV5* inductible est activée par l'IPTG. L'ajout d'IPTG dans le milieu induit l'expression de l'ARN T7 polymérase qui consécutivement aboutit à l'expression du gène cible.

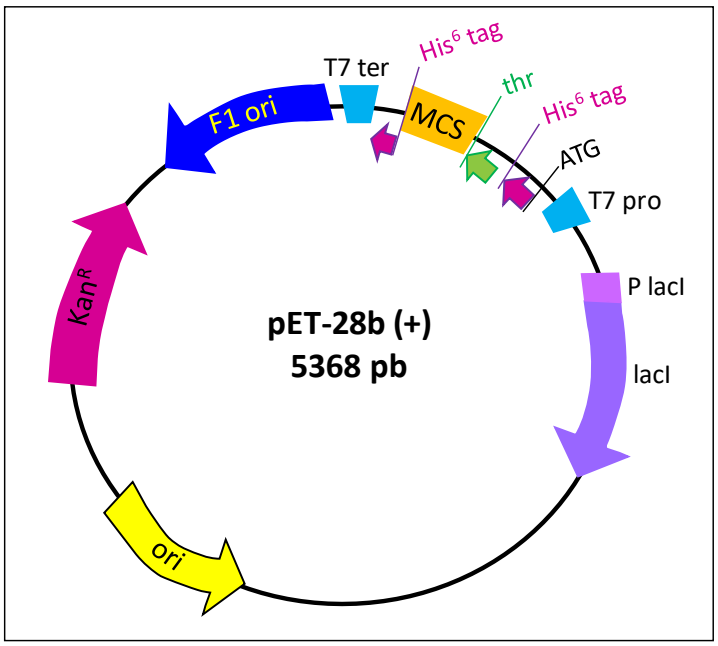


Figure 22 : Représentation schématique du plasmide pET28b. Taille : 5368pb. MCS : site de clonage multiple. T7 tag : étiquette T7. His^6 tag : étiquette hexa-histidine. T7 pro : promoteur T7. T7 ter : terminateur T7. Thr : site de clivage par la thrombine. P LacI : promoteur du gène lacI (gène codant le répresseur lac). ori : origine de réplication du plasmide.

Ce plasmide comprend les éléments suivants (Figure 22) :

- Le site F1 ori représente l'origine de réplication du plasmide qui indique l'orientation de l'insert.
- L'étiquette de fusion hexa-histidine ou « His^6-tag » facilite la détection par des techniques immunologiques et la purification de la protéine d'intérêt par chromatographie d'affinité. Le plasmide permet la construction de protéines de fusion possible avec une étiquette His^6 soit à l'extrémité N-terminale soit à l'extrémité C-terminale de la protéine recombinante. L'étiquette placée à l'extrémité C-terminale peut être optionnellement retirée en gardant le codon stop sur la séquence d'intérêt ou en l'éliminant plus tard avec la thrombine. Cette protéase a un site de clivage spécifique à cette région.
- Le promoteur inductible T7 induit l'expression du gène d'intérêt en présence de l'ARN polymérase T7 activée par une source. Ainsi, la protéine n'est exprimée qu'après ajout d'IPTG dans le milieu. Cela permet de contrôler dans le temps la production de protéines fragiles ou potentiellement toxiques pour la bactérie.
- Le gène conférant la résistance à la kanamycine permet de sélectionner les bactéries transformées.
- Le site MCS correspond au site de clonage multiple contenant les sites de restriction où peut être inséré le transgène.
- Le terminateur T7 situé à la fin de la région MCS, est nécessaire à l'expression efficace de la protéine. Sa séquence est hybridée par des amorces universelles pour faciliter le séquençage de l'insert.

- Le gène *lacI* code le répresseur lac qui permet d'empêcher l'expression basale de la protéine à cause d'une expression résiduelle de l'ARN T7 polymérase par le promoteur *lacUV5*.

La carte du pET28b est identique aux autres systèmes plasmidiques pET28 à l'exception d'un nucléotide « C » qui a été supprimé en amont du site de reconnaissance (GGATCC) de *Bam*HI, (Figure 23). Ce vecteur s'exprime donc à partir du triplet GAT du site *Bam*HI.

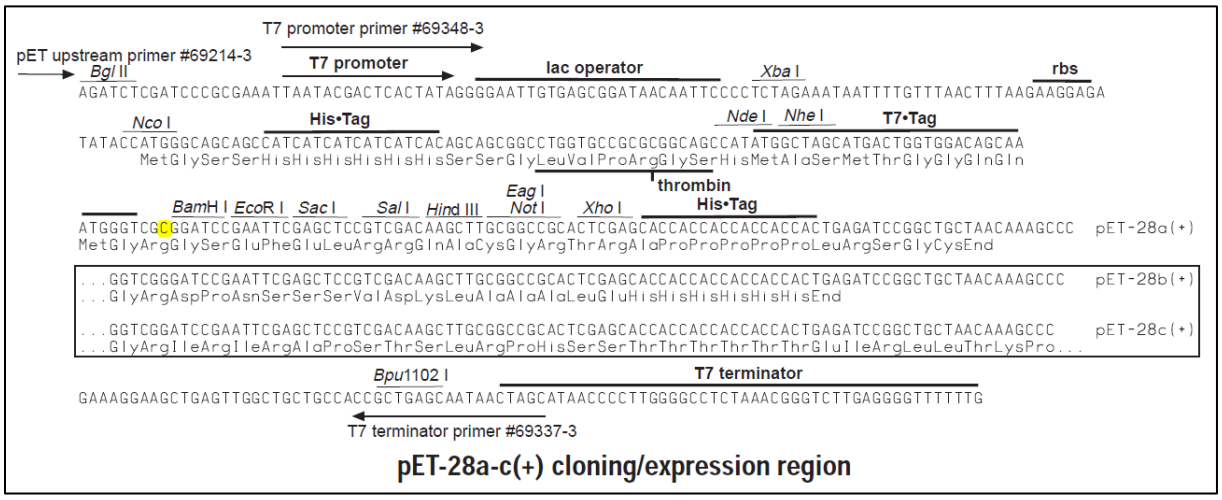


Figure 23 : Séquence nucléotidique de la région d'expression du système pET comprenant les sites de restriction et les étiquettes de fusion His-Tag. rbs : site de fixation du ribosome essentiel à la traduction. Le nucléotide « C » surligné en jaune est absent dans la séquence nucléotidique du plasmide pET28b.

1.4.2.2 Les constructions plasmidiques utilisées comme témoins positifs dans ce travail

1.4.2.2.1 Le plasmide pET3a-*CyHCT*

L'HCT d'artichaut a été utilisée comme témoin positif pour le test de synthèse de DCQ. Le gène codant l'HCT d'artichaut (*CyHCT*) a été cloné dans le pET3a (Figure 24) par Dr. Cinzia Comino (Laboratoire « Plant Genetics and Breeding », Université de Turin, Italie)(Comino *et al.*, 2007) et la protéine a été exprimée dans la souche Rosetta™ 2 d'*E. coli*.

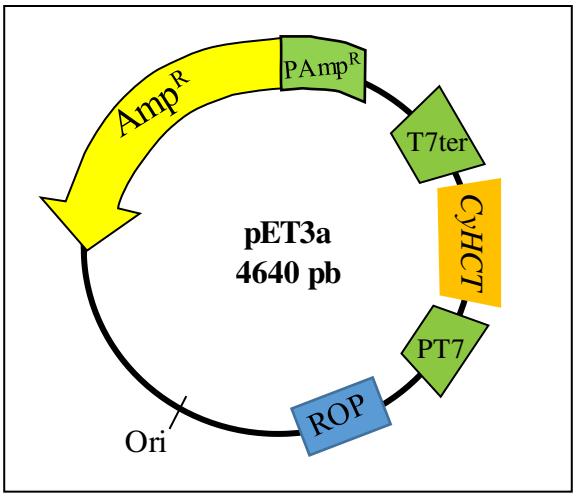


Figure 24 : Représentation schématique du plasmide pET3a. Ori : origine bactérienne de réplication, Amp^R : gène de résistance à l'ampicilline ; $PAmp^R$: promoteur du gène Amp^R ; T7ter : terminateur T7 ; PT7 : promoteur T7 ; ROP : gène « repressor of Primer », dont les effets régulent le nombre de copies du plasmide dans la bactérie.

C'est un plasmide de 4640pb à faible nombre de copies qui permet le clonage et l'expression de gènes dans la bactérie *E. coli*. Ce plasmide dispose de sites de restriction uniques permettant de cloner un gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur T7 (Figure 24) et est inductible par l'IPTG. Le plasmide pET3a est commercialisé par Novagen®.

1.4.2.2.2 Le pGEX-*NtHCT*

L'HCT de tabac (NtHCT) a été utilisée comme témoin positif pour confirmer l'activité de synthèse d'acide chlorogénique. Ce gène a été transmis directement dans le pGEX-KG par Dr Laurent Hoffmann (IBMP, Université Louis Pasteur, Strasbourg) et la protéine a été exprimée chez la souche Rosetta 2 d'*E. coli*.

Le plasmide pGEX-KG (Amersham Biosciences) dérive du plasmide pBR322 et contient le gène de résistance à l'ampicilline. Il contient un promoteur *tac* qui peut être induit par l'IPTG pour induire l'expression de protéines recombinantes fusionnées à des étiquettes glutathion-S-transférase (GST).

1.4.2.3 Le pQE30-*4CL*

Le plasmide pQE30 est commercialisé par Qiagen. Sa taille est de 3,4kb et son origine de réplication est représentée par la région *ColE1* (Figure 25). Ce plasmide est doté de plusieurs propriétés :

- Il confère la résistance à l'ampicilline grâce au gène *bla*.

- Il est équipé du promoteur fort T5 qui active la transcription de la région codante (ORF) d'intérêt insérée dans le site multiple de clonage (MCS) en présence d'une source inductible. L'IPTG est utilisé pour induire l'expression de la protéine d'intérêt. En son absence, le répresseur LacI interagit avec l'opérateur LacO et réprime l'expression du gène d'intérêt. Ce vecteur s'exprime dans des souches d'*E. coli* spécifiques comme la souche M15[REP4].
- Il contient une séquence 6xHis en 5' qui permet d'avoir une protéine « his-taggée » à l'extrémité N-terminale.

La région codante de la 4CL1 a été isolée de *Nicotiana tabacum* dont l'activité de l'enzyme codée a été décrite par Lee et Douglas (Lee et Douglas, 1996). La séquence a été clonée dans le plasmide pQE30 par le Professeur Douglas (Département de Botanique, Université de Colombie Britannique, Vancouver, Canada).

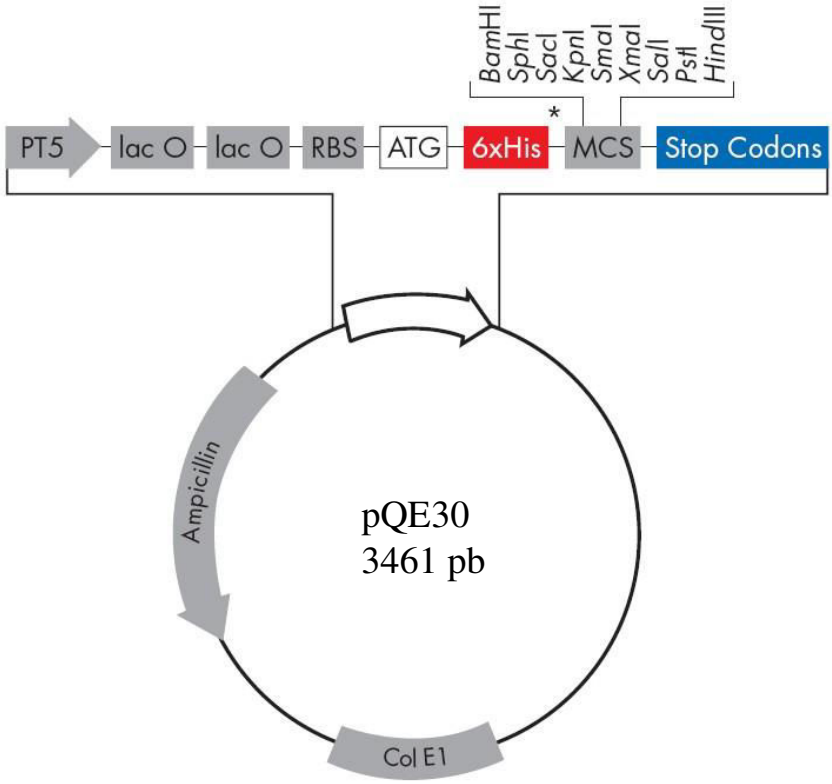


Figure 25 : Représentation schématique du pQE30. PT5 : promoteur T5. RBS : site de fixation au ribosome. 6xHis : étiquette 6xHis fusionnée à la séquence codante en 3'. Ampicilline : gène bla codant pour la β-lactamase. Lac O : opérateur lac.

1.4.2.4 Le plasmide binaire pGWB2-GW

Le plasmide pGWB2-GW a été développé et envoyé par l'équipe de Tetsuya Kimura (Nakagawa *et al*., 2007). Ce vecteur de destination est utilisé pour le clonage et l'expression

constitutive d'un gène d'intérêt lors de transformation de plantes (stable ou transitoire). Il contient un ADN-T entre les bordures gauches (LB) et droites (RB) composé des éléments suivants (Figure 26) :

- Le promoteur 35S issu du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), placé en amont du gène d'intérêt, permet une expression constitutive.
- Le gène *hpt* (codant l'hygromycine phosphotransférase), placé sous le contrôle du P35S, confère la résistance à l'hygromycine pour permettre de sélectionner les cellules végétales transformées.
- Les sites de recombinaison *attR1* et *attR2*, reconnus par la LR clonase, permettent le clonage directionnel du gène dans le plasmide par LR recombinaison avec les sites *attL1* et *attL2* de pCR8.
- Le gène *nptII* (codant la néomycine phospho transférase II), placé sous le contrôle du promoteur et du terminateur de la nopaline synthase (Pnos et Tnos), permet la sélection par la kanamycine des cellules bactériennes transformées.

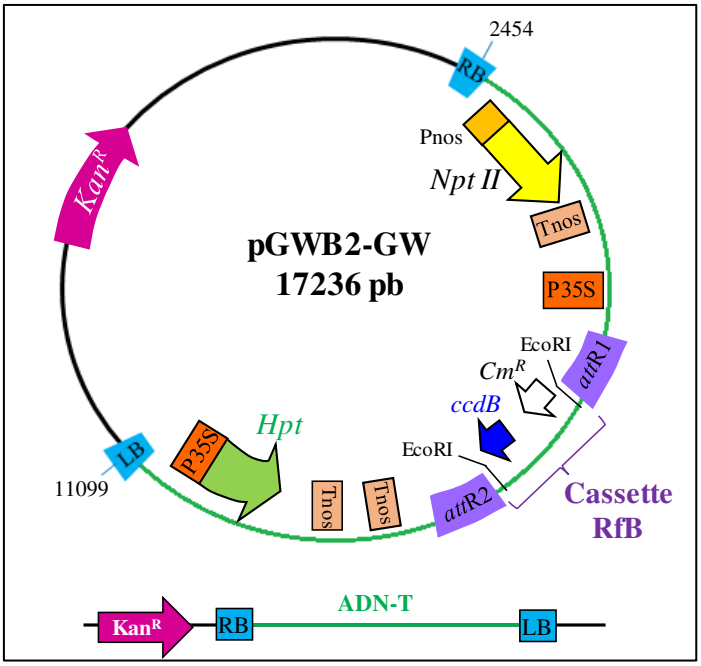


Figure 26 : Représentation schématique du plasmide pGWB2-GW. Taille : 17236 pb. De LB (Left border) à RB (Right Border) sur l'ADN-T : P35S promoteur du virus de la mosaïque du chou-fleur ; hpt : gène de résistance à l'hygromycine. Tnos : terminateur de la nopaline synthase. attR1, attR2 : sites de recombinaison pour la LR recombinaison; RfB : cassette de recombinaison ; ccdB : gène de létalité d'E. coli. Cm^R : gène conférant la résistance au chloramphénicol ; nptII : gène codant la néomycine phosphotransférase ; Pnos : promoteur du gène codant pour la nopaline synthase. Kan^R : gène de résistance à la kanamycine.

- La cassette RfB est encadrée par les sites *att*. Elle contient le gène *ccdb* qui entraîne la létalité cellulaire chez *E. coli*. Afin de multiplier le plasmide qui présente ce gène, nous utilisons une souche de bactérie résistante : la *ccdB* survival^{TM}. La cassette renferme

également le gène Cm^R qui confère la résistance au chloramphénicol permettant ainsi de sélectionner et de maintenir le plasmide non recombiné dans la bactérie.

En dehors de l'ADN-T, le plasmide pGWB2-GW contient le gène Kan^R qui confère aux bactéries transformées la résistance à la kanamycine.

2 Les outils de bioinformatique

Les 13 séquences candidates ont été récupérées à partir de la banque RNAseq de PAT et ont été alignées avec des acyltransférases BAHD récupérées sur Genbank (Annexe 12) en utilisant l'outil Clustal W (matrice Blosum80) *via* le logiciel BioEdit (version 7.2.3). Les régions consensus ont été recherchées avec un seuil d'acceptation de conservation des séquences de 95%. Un arbre phylogénétique a été construit à l'aide du logiciel MEGA 6 (version 6.06) en utilisant la méthode Neighbour-Joining (model Poisson ; distance de séparation : 4). Les valeurs des Bootstraps ont été calculées avec 1000 répétitions. L'acyltransférase *Ec*ATA (ID : NP_312354.1) issue d'*E. coli* a été choisie comme groupe extérieur pour enraciner l'arbre.

La recherche d'homologie des séquences peptidiques a été réalisée avec l'outil d'alignement BLAST.

3 Les outils de microbiologie

3.1 Mise en place des conditions stériles

La manipulation des micro-organismes doit se dérouler sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Pour maintenir les conditions stériles, les champignons et les bactéries sont manipulés sous une hotte à flux laminaire vertical. Les milieux de culture et la verrerie (erlenmeyers, bouteilles Schott, etc…) sont stérilisés à l'autoclave (120°C, 20 min, 1 bar). Les milieux gélosés sont préparés dans des boîtes de Pétri stériles de 9 cm de diamètre. A chaque utilisation, les instruments métalliques (anses, pipettes Pasteurs, pinces, etc...) sont plongés dans l'éthanol 70% puis flambés. Les solutions stériles sont également ouvertes près d'une flamme.

3.2 Les conditions de culture des bactéries

3.2.1 Les milieux de culture

Les bactéries sont cultivées en milieu liquide ou sur un milieu solidifié avec 2% d'agar. Leur température optimale de croissance est de 37°C pour les souches dérivant d'*E. coli* et 28°C pour les Agrobactéries. Le milieu LB (Lysogeny Broth) est utilisé pour la culture d'*E. coli*. Sa composition et sa préparation sont indiquées dans le Tableau 8. Pour la culture des Agrobactéries, on utilise le milieu YEB (Yeast Extract Beef extract) (Tableau 9). Pour assurer une bonne oxygénation des cellules, les cultures liquides sont maintenues sous agitation rotatoire (200 rpm) dans des erlenmeyers en respectant un rapport de volume liquide/air de 1 :3.

Composé	Concentration (g/L)	Poudre commerciale
Tryptone Extrait de levure NaCl Agar (si milieu solide)	10 5 10 20	- Ref. L3522, Sigma-Aldrich - Préparation: 25g/L dans H_2O distillée
pH	7,5	

Tableau 8 : Composition du milieu LB (Lysogeny Broth)

Composé	Référence fournisseur (Sigma-Aldrich)	Concentration (g/L)
Extrait de bœuf	B4888	10
Extrait de levure	92144	5
Peptone	73049	10
Saccharose	84100	15
$MgSO_4$	434183	0,5
Agar (si milieu solide)	A5306	20
pH		7,2

Tableau 9 : Composition du milieu YEB (Yeast Extract Beef extract).

3.2.2 Les antibiotiques utilisés

Certains milieux sélectifs doivent être préparés en rajoutant l'antibiotique approprié. Les concentrations des antibiotiques et leur mode de préparation sont indiqués dans le Tableau 10.

Antibiotique	Références Fournisseur	Concentration stock	Concentration finale (mg/L)
Spectinomycine	S0188*	100 mg/mL dans DMSO/H_2O 1:1	100
Streptomycine	S0148*	100 mg/mL dans EDTA 1mM	100
Kanamycine	K0126*	50 mg/mL dans dH_2O	25
Rifampicine	R0146*	50 mg/mL dans dH_2O	100
Ampicilline	A0104*		100
Hygromycine	H0192*		100
Chloramphénicol	C0113*		100

*Tableau 10 : Liste des antibiotiques utilisés comme agents de sélection des bactéries. * Kalys, Bernin, France.*

3.3 Les conditions de culture des champignons

Espèce fongique	Milieu de culture	Composition du milieu pour 1L
Botrytis cinerea	PDB (Potato Dextrose Broth)	- 24g de poudre PDB (Ref. P6685, Sigma-Aldrich)
	PDA (Potato Dextrose Agar)	- 39g de poudre PDA (Ref. 70139, Sigma-Aldrich) - 2g de glucose
Phytophthora parasitica	V8 5% agar	- 200mL de jus V8® Campbells - 2g $CaCO_3$ - 20g d'agar Bacto (Ref. A5306, Sigma-Aldrich)

Tableau 11 : Composition des milieux de culture pour les espèces fongiques étudiées.

Les cultures sont renouvelées en disposant trois fragments d'agar issus de la culture d'origine sur le milieu de culture approprié (Tableau 11). Les boîtes de Pétri sont incubées à l'obscurité à 25°C pendant 10 jours pour *Botrytis cinerea* et 15 jours pour *Phytophthora parasitica*.

4 Les outils de biologie moléculaire

4.1 L'extraction et la détection des acides nucléiques

4.1.1 Extraction des ARN

Avant d'entreprendre une extraction d'ARN, le matériel et le plan de travail doivent être nettoyés au RNAseZap (AM9780, Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pour éliminer les RNAses. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kit » (74903 ; Qiagen, Courtaboeuf, France) dont le protocole est décrit en Annexe 2. Après purification, il peut rester quelques traces d'ADN génomique qui pourraient donner de faux positifs dans des réactions d'amplification. L'ADNg est donc éliminé par un traitement à la DNAse avec le kit TURBO DNA-free™ (Ambion, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Les procédures sont indiquées en Annexe 3. Les échantillons doivent être conservés à -20°C ou -80°C en cas d'utilisation ultérieure. La qualité des ARN doit être vérifiée sur gel d'agarose. L'observation des 2 bandes correspondant aux ARN ribosomiques indique l'absence de dégradation des ARN (Annexe 3). L'absence d'ADNg est vérifiée par une PCR contrôle sur ARN où l'on ne doit obtenir aucune amplification.

4.1.2 Extraction de l'ADN génomique

Les extractions d'ADN génomique ont été effectuées pour la caractérisation des tabacs transgéniques en suivant les indications données dans le protocole fourni dans le kit « DNeasy Plant Mini Kit » (Annexe 4). Les ADNg ont été obtenus à partir de jeunes feuilles de *vitro* plants de tabac. Les ADNg sont dosés au Qubit (Invitrogen™) (cf δ 4.2) et leur présence est vérifiée par une PCR contrôle avec des amorces spécifiques d'un gène ubiquitaire comme l'actine.

4.1.3 Extraction d'ADN plasmidique à partir de bactéries transformées

Une colonie bactérienne possédant le plasmide est mise en culture dans 2mL de LB stérile (avec les antibiotiques de sélection) afin de multiplier le plasmide. Après 18h de culture, la suspension bactérienne est centrifugée pendant 3 minutes à 12400xg. Les bactéries sont lysées par un détergent en milieu alcalin afin de libérer l'ADN génomique et plasmidique. L'ADN

plasmidique est extrait selon les procédures du kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (PLN350, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) détaillées en Annexe 5.

4.1.4 Migration sur gel d'électrophorèse et révélation des acides nucléiques

Les acides nucléiques (plasmides, ADNc, ADNg, produits de PCR, ARN) sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1 à 1,5% (m/v) préparé dans du tampon TAE (Tris acétate 40mM, EDTA 1mM, pH8).

4.1.5 Extraction d'un gène à partir d'un gel d'électrophorèse

Le fragment d'ADNc amplifié par PCR doit être extrait du gel d'agarose et purifié afin de le cloner dans un plasmide d'expression. La bande correspondant au gène cible est excisée du gel sous lampe UV et le gène est purifié selon les procédures du kit « MinElute PCR purification » (28004, Qiagen) décrites en Annexe 10.

4.2 La quantification des acides nucléiques et des protéines

Les acides nucléiques sont quantifiés à l'aide du fluorimètre Qubit™ 3.0 (Invitrogen™). Ce système utilise des marqueurs fluorescents qui se fixent spécifiquement à la molécule cible (ADN, ARN, protéine). La détection de la fluorescence est plus sensible, plus précise et plus spécifique que les mesures d'absorbance UV à 260 nm (ADN et ARN) et 280 nm (protéines) au spectrophotomètre. La limite de détection de l'appareil est de 10ng/mL pour l'ADN, 250ng/mL pour l'ARN et 12,5µg/mL pour les protéines totales.

Une solution de dilution est préparée en mélangeant N µL de fluorophore et N x 199 µL. N représente le nombre d'échantillons et d'étalons. 10µL de solution de référence sont dilués dans 200µL final et 2-20µL d'échantillon selon la concentration attendue en ADN, ARN et protéine. Les échantillons sont immédiatement vortexés et peuvent être analysés au bout de 2 minutes pour les acides nucléiques et 15 minutes pour les protéines. Avant de faire les mesures, l'appareil doit être calibré avec les solutions de référence. L'appareil donne directement les valeurs de concentration de l'échantillon. Si l'échantillon n'est pas compris dans la gamme de référence ou est en dehors du seuil de détection, il doit être dilué et sa concentration doit être multipliée par le facteur de dilution.

4.3 La synthèse des ADNc ou transcription inverse

La transcription inverse consiste en la conversion des ARN messagers (ARNm) en ADNc. La transcription est effectuée par l'ADN polymérase ARN dépendante (ou transcriptase inverse). Les ADNc sont synthétisés avec le kit « High capacity cDNA Reverse Transcription » (4368814, Applied Biosystem, Thermofisher Scientific) en suivant les recommandations du fournisseur. Dans un microtube de 200µL, la réaction se fait avec 10µL de tampon de réaction RT 2x (contenant les dNTP, des amorces aléatoires, et la MultiScribe™ reverse transcriptase), et 10µL d'ARN totaux (0,02µg à 2µg). Les étapes du programme de la réaction sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	Etape 1	Etape 2	Etape 3	Etape 4
Température (°C)	25	37	85	4
Durée	10 min	120 min	5 min	∞

Les ADNc synthétisés peuvent être utilisés pour étudier l'expression des gènes par qPCR ou pour l'amplification de séquences codantes par PCR suivi d'un clonage dans un plasmide d'expression. La RT peut être couplée à une PCR en une seule étape comme décrit ci-après.

4.4 La RT-PCR

La RT-PCR est une technique qui permet d'amplifier directement l'ADNc à partir de l'ARNm. Cette réaction se fait en une seule étape avec le kit « SuperScript™ One-step RT-PCR system with Platinum® Taq DNA polymerase » qui combine simultanément les réactions de transcription et d'amplification. La *Taq* polymerase Platinum catalyse la synthèse du second brin d'ADNc en utilisant le premier brin comme matrice. Sa particularité est d'être activée après l'étape de dénaturation à 94°C, ce qui améliore la sensibilité et la spécificité. Puis la PCR va amplifier le fragment d'ADNc. Les réactions s'effectuent suivant le protocole décrit en Annexe 9.

4.5 L'amplification des gènes d'intérêt par PCR et la PCR en temps réel (qPCR)

4.5.1 Les applications ciblées

Dans le cadre de ce travail, les conditions de PCR et les amorces utilisées ont été déterminées en fonction de diverses applications :

- L'amplification des gènes candidats à partir des racines d'ipomée (Tableau 16)
- Le clonage de séquences codantes dans un plasmide d'expression hétérologue

- L'analyse de l'expression des gènes (qPCR)
- Le criblage et l'identification des bactéries recombinantes et des plantes transgéniques (tabacs *in vitro*)
- La vérification de l'insertion d'un gène dans un plasmide et de son sens d'insertion.

Dans le cas d'un criblage de bactéries, la PCR peut s'effectuer directement sur la colonie bactérienne en la piquant avec une pointe de cône et en plongeant la pointe dans le mélange réactionnel. Dans l'autre cas, elle se réalise avec 1µL du plasmide isolé de la bactérie. La sélection des tabacs transgéniques est effectuée sur de l'ADN génomique extrait d'un tissu.

4.5.2 L'élaboration des amorces de PCR et de qPCR

Chaque amorce est caractérisée par sa température de fusion (Tm). Le Tm peut être calculé de différentes manières. Pour les réactions de PCR réalisées dans ce travail, nous avons utilisé la formule mathématique suivante :

$$Tm = 59,9 + (41x\ GC/N) - (675/GC).$$

N représente le nombre de nucléotides dans l'amorce et GC correspond au nombre de nucléotides GC dans la séquence oligonucléotidique. Cette équation est utilisée pour des amorces de taille supérieure à 20 nucléotides. Ce Tm a été utilisé pour les réactions de PCR effectuées avec le kit Master mix (Tableau 19).

Pour les réactions de PCR réalisées avec la *Taq* HiFi, le Tm des amorces a été calculé avec le logiciel Oligo Calc (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html). Cette application donne des valeurs de Tm autour de 60°C, ce qui augmente la spécificité de l'enzyme.

Pour la PCR en temps réel (qPCR), les amorces ont été élaborées à l'aide du logiciel Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi). Les Tm ont été calculées par ce logiciel.

4.5.2.1 Les amorces utilisées pour le clonage des gènes candidats dans le plasmide d'expression

En vue de cloner ces gènes dans le plasmide pET28b, les amorces sont imaginées en fonction des caractéristiques du plasmide et du gène d'intérêt (Tableau 12).

Nom	Site de restriction	Gène amplifié	Séquence de l'amorce (5'→ 3')	Tm (°C)	Tm (°C) Calculator	Taille de l'amplicon (pb)
IbHCT Dir	*Bam*HI	HCT d'*Ipomoea batatas*	CGG TTT GGA TCC AAT GAA GAT CAG CGT GAA GGA G	60	60	1296
IbHCT Rev	*Xho*I		CGC TCG AGA ATA TCA TAC AGG AAC TCT TTG AAG	56	57	
IbHQT Dir	*Bgl*II	HQT d'*Ipomoea batatas*	CGA GAT CTG ATG GCA AGT GAG AAG TTT AAG ATT AGC A	63	63	1224
IbHQT Rev	*Hind*III		CGA AGC TTT CCT TGT TTG GGG CTG GG	62	63	
Ib3 Dir	*Nde*I	Séquence n°3	CCC ATA TGG AGA ACG GAA ACG GGT GCA A	58	63	1317
Ib3 Rev	*Hind*III		CGA AGC TTG AAA TGG TGC GGC ATA AGG C	58	63	
Ib4 Dir	*Nco*I	Séquence n°4	CGC CAT GGT TGC TAA GAG AGA TTT GAG C	56	61	1395
Ib4 Rev	*Xho*I		CGC TCG AGA TTC AAA TCA AGG TAT TCA GAA G	55	61	
Ib5 Dir	*Bam*HI	Séquence n°5	GGG TTT GGA TCC AAT GCC TTC GTC TTC GAT TGT TG	60	65	1374
Ib5 Rev	*Hind*III		CGA AGC TTC TCA CTG CGA AGT CCG GCC AT	60	66	
Ib6 Dir	*Nco*I	Séquence n°6	CGC CAT GGA ACA CCA TTG GCT GCC	57	62	1332
Ib6 Rev	*Xho*I		CGC TCG AGA ATC AAG CCA AGA TAT TCA GAG GTG AT	58	63	
Ib7 Dir	*Nco*I	Séquence n°7	CGC CAT GGA ACA CCA TTG GCT GCC	57	63	1332
Ib7 Rev	*Xho*I		CGC TCG AGA ATT CAA ATC AAG GTA TTC AGA AGT CAT	57	63	
Ib8 Dir	*Nco*I	Séquence n°8	CGC CAT GGC GCT AAA AGT TGA AAT ACA TCA GAA AGA	58	63	1332
Ib8 Rev	*Xho*I		CGC TCG AGC TGC GAA GTG GGC AGT T	59	64	
Ib9 Dir	*Nde*I	Séquence n°9	CCC A TGG TGT GGT CGT TTC CTC CAC	57	63	1417
Ib9 Rev	*Xho*I		CGC TCG AGG GAC GAA TTA GTC ATC TTC TTT G	58	63	
Ib10 Dir	*Nco*I	Séquence n°10	CGC CAT GGG TGT TAA GAT AGA AAG CAC GAG AAT C	59	64	1317
Ib10 Rev	*Xho*I		CGC TCG AGA GAG AAT AGC AAT TGC GCT GGA A	59	64	

Tableau 12 : Amorces spécifiques des séquences candidates d'Ipomoea batatas pour le clonage dans les plasmides d'expression. Tm calculé avec la formule mathématique ou avec le logiciel OligoCalc.

Chaque séquence d'amorce contient un site de restriction compatible avec la région MCS du plasmide pET28b. Ces sites de restriction ne doivent pas être présents dans la séquence du gène pour que le gène reste intact lors de la digestion enzymatique. Dans les amorces « Directe » contenant les sites de restriction *Bam*HI, un nucléotide « **A** » supplémentaire a été inséré avant le codon « ATG » ou « start » (qui marque le début de la traduction) de sorte que le codon « start » soit en phase avec le premier codon « GAT » présent dans le site *Bam*HI (cf δ 1.4.2.1) qui indique le cadre de lecture. Le codon stop a été enlevé de la séquence Reverse afin de fusionner la séquence hexa-histidine à l'extrémité C-terminale de la protéine. Pour la construction des plasmides pET28b-*IbHCT* et pET28b-*Ib9*, les séquences *Ib9* et *IbHCT* ont été récupérées à partir de la banque RNAseq de PAT. Ces gènes ont été isolés à partir de racines de plantes stressées à l'azote. Les ARN ont été extraits et rétro-transcrits. Les ADNc ont été ensuite amplifiés par RT-PCR avec les amorces du Tableau 12.

4.5.2.2 Les amorces utilisées pour l'isolement des séquences d'HCT d'autres espèces

Nom	Site de restriction	Gène amplifié	Séquence de l'amorce (5'→3')	Tm (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
CcHCT Dir	*Bam*HI	HCT de *Coffea canephora* n°EF137954 (NCBI)	CCCGGATCCAATGAAAATC GAGGTGAAGGA	50	1336
CcHCT Rev	*Xho*I		GGCTCGAGAATGTCATACA AGAAACTCTGGA	51	
CyHCT Dir	-	HCT de *Cynara cardunculus* n°DQ104740 (NCBI)	GGAGATGAAGATCGAGGT GAGAGAATCA	54	1310
CyHCT Rev	-		TTTAGATATCATATAGGAA CTTGCTGAAAAGCTTC	53	

Tableau 13 : Amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant les HCT de café et d'artichaut.

En parallèle de l'HCT d'ipomée, nous avons cloné des séquences codant des HCT d'autres espèces végétales. Ces gènes, dont la séquence est disponible dans la Genbank, ont été amplifiés en utilisant les amorces listées dans le Tableau 13. Les amorces spécifiques du gène correspondant à l'HCT de café ont été conçues de sorte à cloner le gène dans les plasmides d'expression. La séquence a été synthétisée avec le site de restriction *Bam*HI en 5' et le site *Sac*I en 3' pour la cloner dans le vecteur pET28b.

Les amorces spécifiques du gène de l'HCT d'artichaut (*CyHCT*) ont été conçues pour cloner le gène dans le plasmide pET3a.

4.5.2.3 Amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire des tabacs transgéniques

Les oligonucléotides qui ont servi à amplifier les ADNg dans les tabacs transgéniques sont présentées dans le Tableau 14. Ces amorces ont été utilisées pour vérifier la présence du transgène dans le génome des tabacs transformés avec les HCT correspondantes.

La séquence nucléotidique *pNep2* correspond à une séquence partielle du promoteur du gène codant la népenthésine 2, une protéase synthétisée dans les glandes digestives d'une plante carnivore du genre *Nepenthes*. Cette séquence n'est pas fonctionnelle car elle est incomplète. De plus, ce gène n'existe pas chez le tabac et n'a aucun lien avec la synthèse des dérivés d'acide caféoyl-quinique. Cette séquence a été clonée dans le pGWB2 afin de l'utiliser comme témoin négatif pour obtenir des plantes transgéniques sans le gène d'intérêt.

Nom	Gène amplifié	Séquence de l'amorce (5'→3')	Tm (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
IbHCT Dir	HCT d'*Ipomoea batatas**	AGA TCA GCG TGA AGG AGT CGA CGA TG	59	266
IbHCT Rev		GCC GGC GCC ATT ACA GTC AAT CTC AA	56	
CcHCT Dir	HCT de *Coffea canephora* n°EF137954 (NCBI)	CCC GGA TCC AAT GAA AAT CGA GGT GAA GGA	56	1336
CcHCT Rev		GGC TCG AGA ATG TCA TAC AAG AAA CTC TGG A	56	
pNep2 Dir	Promoteur du gène pNep2	TGG GTT AGA TAT AGT TCC TCA ACC TCG TG	55	352
pNep2 Rev		CCT CAA ATT ATT AGT CTC TGT AGA AGA AGG TGT	54	
NtAct Dir	Actine de *Nicotiana tabacum*	CGT CTG TGA TAA TGG GAC TGG AAT GGT CA	56	301
NtAct Rev		GTC CGA CTT TAC TCG AAC CTC GTG AG	56	

*Tableau 14 : Amorces utilisées pour amplifier les fragments des gènes d'intérêt dans les ADNg des tabacs transgéniques. * séquence isolée chez Ipomoea batatas IDN°033 (n° accession du brevet).*

4.5.2.4 Les amorces utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes candidats chez l'ipomée

4.5.2.4.1 Les amorces spécifiques des gènes de référence

La quantification relative du gène cible doit être normalisée par rapport à un gène de référence afin de limiter les variations d'expression liées aux conditions expérimentales. Un gène de référence est un gène dont l'expression est ubiquitaire et ne varie pas quel que soit le stade de développement ou le tissu étudié. Pour analyser l'expression des gènes candidats chez l'ipomée, plusieurs gènes de référence ont été sélectionnés sur la base des travaux décrits dans la littérature (Czechowski *et al.*, 2005; McGregor, 2006; Park *et al.*, 2012). Quatre gènes de référence ont été utilisés (Tableau 15).

Nom	Séquence de l'amorce (5'→ 3')	Tm (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
ARF (*ADP-ribosylation Factor)*	Dir: CTTTGCCAAGAAGGAGATGC	60	185
	Rev: TCTTGTCCTGACCACCAACA		
RPL *(protéine ribosomique du chloroplaste)*	Dir: TTTGACCGAAATGCCCTTAG	58	160
	Rev: TTCTGGTTCACCCCAACATT		
PLD *(phospholipase D1)*	Dir: ATCGGAATCAGCAGTGATGG	60	144
	Rev: ATGATGAGGCAAGCAGTGTG		
Efα (*facteur d'élongation 1α*)	Dir: TGA GAT GCA CCA CGA AGC TC	67	51
	Rev: CCA ACA TTG TCA CCA GCA AGT G		

Tableau 15 : Amorces utilisées pour les analyses de qPCR pour l'expression des gènes candidats chez Ipomoea batatas. Fragments amplifiés par qPCR analysés sur gel d'agarose. Les amorces ont été dessinées à partir des séquences des gènes ARF (ID : JX177359.1), RPL (ID : AY596742), PLD (JX177360) et EFα (ID : AF120093).

4.5.2.4.2 Les amorces spécifiques des gènes candidats

Les amorces spécifiques de chaque gène sont consignées dans le Tableau 16. Le profil d'expression de ces gènes est comparé entre les 2 conditions étudiées afin de sélectionner les gènes qui répondent à la synthèse d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ.

Nom	Séquence de l'amorce (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)
IbHQT_Dir	AAGAATGGACGACGAGTACCTAAGAT	61
IbHQT_Rev	AGAGATCCGGTTGGCATTCC	
IbHCT_Dir	ACCTCCAATCCAAGCCTGTCT	53
IbHCT_Rev	CCAACGCGCCGTGAA	
Ib3_Dir	TCGGGCTTCGTCTGGAAAG	53
Ib3_Rev	CTGCTCCGGCTTCATTCG	
Ib4_Dir	AGCCCTGACGAGGGAACAT	58
Ib4_Rev	CGGACGGTGGGCTTCA	
Ib5_Dir	TTTCCTCGTTCCAGTCCTTGA	57
Ib5_Rev	TTCCTGGCGCGGGTTAC	
Ib6_Dir	TGCCTACTCGGCCAACATG	64
Ib6_Rev	GGCTTGGCCTGAGCTACCT	
Ib7_Dir	GCCTACTCGGCCAACATGTT	62
Ib7_Rev	GCGGTTTGGCCTGAGCTA	
Ib8_Dir	TGGAATGACAATCGAGTGCAA	54
Ib8_Rev	AACATTCGCCCGCACAA	
Ib9_Dir	ACGAGGCCCCCATGCT	54
Ib9_Rev	CCCACCACTCGAAGTCAAAGA	
Ib10_Dir	TCAAGCCATCTGCGTCATTG	58
Ib10_Rev	AAGCTCGACCACCCCCTTA	
Ib11_Dir	TCCATGCTGCCATTGAACTTAG	57
Ib11_Rev	CGAATCTCCGGGACTCAATC	

Tableau 16 : Amorces de qPCR spécifiques utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes chez Ipomoea batatas.

4.5.2.4.3 Les amorces spécifiques des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes chez l'ipomée

Nom	Séquence de l'amorce (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)
IbC4H-dir	ATT CTT GTC GCC ATT GTT GTG T	57
IbC4H-rev	CCG GCG GGA GCT TGT AC	
Ib4CL-dir	CTG GCG CTG GCC AAG A	57
Ib4CL-rev	CAC CCG AAT CGA GCT CAAA AT	

Tableau 17 : Amorces de qPCR spécifiques des gènes de la voie des phénylpropanoïdes chez Ipomoea batatas. C4H (ID : GQ373157), 4CL (ID : AB469557 .1).

Les amorces des gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes ont été conçues à partir des séquences disponibles dans la base de données NCBI (Tableau 17).

4.5.2.5 Les amorces utilisées pour l'expression des gènes d'intérêt dans les tabacs transgéniques

	Nom	Séquence de l'amorce (5'→3')	Tm (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
Gènes de référence	EF1α-Dir	TGA GAT GCA CCA CGA AGC TC	67	51
	EF1α-Rev	CCA ACA TTG TCA CCA GCA AGT G		
	L25-Dir	CCC CTC ACC ACA GAG TCT GC	60	51
	L25-Rev	AAG GGT GTT GTT GTC CTC AAT CTT		
Gènes d'intérêt	IbHCT-Dir	ACCTCCAATCCAAGCCTGTCT	58	53
	IbHCT Rev	CCAACGCGCCGTGAA		
	CcHCT-Dir	CGACGGGATCATCGAATTTC	57	56
	CcHCT-Rev	TCGGCTCAAAGCGTCCTTT		

Tableau 18 : Amorces spécifiques des gènes de référence et des gènes d'intérêt pour l'analyse de l'expression par qPCR. IbHCT (ID N°033 du brevet FR2991326) et CcHCT (ID (Genbank) : EF137954).

Dans le cadre de l'analyse de l'expression des gènes d'intérêt dans les tabacs transgéniques, deux gènes de référence interne sont décrits dans la littérature comme étant fiables pour ce type d'analyse : EF1α et L25 (Schmidt et Delaney, 2010). Les amorces des gènes d'intérêt ont été synthétisées à partir des séquences qui ont servi à la transformation des tabacs (Tableau 18). L'intérêt de cette analyse est de vérifier l'expression des gènes d'intérêt (HCT d'ipomée et de café) dans les différents événements de transformation. L'amplification avec ces amorces conduit à des fragments d'environ 50pb qui sont ensuite vérifiés sur gel (Tableau 18).

4.5.3 Les conditions de PCR

Les conditions de PCR varient en fonction du type de polymérase utilisée, de la sensibilité de l'enzyme mais également de la matrice à amplifier. Les différentes méthodes de PCR utilisée dans ce travail sont consignées dans le Tableau 19.

***Taq* Polymérase utilisée**	**Utilisation**	**Composition du mix réactionnel**	**Programme PCR**
Master Mix (Invitrogen, Thermofisher Scientific)	- Vérification de l'insertion dans un plasmide - Caractérisation moléculaire des plantes	- 10µL Master Mix 2x - 1µL amorce Dir 10µM - 1µL amorce Rev 10µM - Qsp 20µL H_2O ultra-pure stérile - 1µL matrice	- 94°C, 5min - 94°C, 15 sec - Tm amorces, 15sec - 72°C, 2 min - 72°C, 10 min - 4°C, ∞
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Thermofisher Scientific)	Isolement de IbHCT pour le clonage dans le pCR8	- 2,5µL Tampon HiFi 10x - 0,5µL dNTPmix 0,2mM - 1µL $MgSO_4$ 50 mM - 1µL amorce Dir 10µM - 1µL amorce Rev 10µM - 0,25µL Taq polymérase HiFi - 2µL ADNc - Qsp 25µL H_2O Ultra-pure stérile	- 94°C, 5min - 94°C, 30 sec - Tm amorces, 30 sec - 68°C, 1,5min - 68°C, 10min - 4°C, ∞
Prime Star® Max DNA polymerase (Takara)	Isolement du gène Ib9 pour le clonage dans le pET28b	- 25µL Prime Star mix - 1µL amorce Dir (10µM) - 1µL amorce Rev (10µM) - Qsp 50µL H_2O ultra-pure stérile	- 94°C, 5min - 98°C, 10sec - 60°C, 15sec - 72°C, 1min - 72°C, 10min

Tableau 19 : Mode de préparation et conditions de PCR pour l'amplification des gènes et composition du mélange réactionnel.

L'amplification du gène codant l'HCT d'ipomée a été réalisée avec la Platinum® *Taq* polymérase High Fidelity (*Taq* Hifi). Cette amplification n'ayant pas marché pour le gène *Ib9*, un autre kit a été testé en utilisant la Prime Star® Max DNA polymérase (TAKR045A ; Ozyme).

Grâce à sa haute-fidélité et son efficacité d'hybridation, cette enzyme est plus processive et facilite l'extension des produits PCR (30-60 sec/ kb), ce qui permet d'utiliser des plus grandes quantités de matrice (>200ng) dans le cas où le gène est faiblement exprimé. C'est une enzyme « Hot start » c'est-à-dire qu'elle ne s'active qu'à partir de 98°C pendant la dénaturation, ce qui limite les hybridations aspécifiques à température ambiante et la dégradation des amorces et matrices. L'enzyme est conditionnée dans un tampon de réaction 2x (contenant les 4 dNTP et Mg^{2+}). Cependant cette enzyme ne rajoute pas les nucléotides A aux extrémités du fragment amplifié comme le fait la *Taq* polymerase dans les réactions de PCR classique (cf 4.5.3). Il est donc nécessaire de les rajouter après la réaction. Pour procéder à ce traitement, 1µL du tampon Master Mix est ajouté à 3µL du produit PCR purifié (cf δ 4.1.5). Le tout est incubé pendant 10 minutes à 72°C. Le produit PCR-A (nucléotides A ajoutés sur les deux bouts du fragment) est ensuite cloné dans le plasmide pCR8 (cf δ 4.6.1).

4.5.4 Les conditions de qPCR

La PCR en temps réel permet de mesurer l'amplification d'un fragment d'ADN au cours du temps (« en temps réel »). A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN formée est mesurée grâce à un signal fluorescent. L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. Le marqueur fluorescent utilisé est le SYBR® Green, qui émet un signal fluorescent lorsqu'il se lie à l'ADN double brin.

En comparaison avec la PCR, c'est une méthode plus spécifique (température d'hybridation plus élevée) et plus sensible (détection grâce à un fluorophore et non un agent intercalant) qui permet d'obtenir des données quantitatives.

Chaque échantillon est caractérisé par son cycle seuil ou Ct (Cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles minimum à partir duquel la quantité du produit formé est distinct du bruit de fond. La valeur du Ct permet d'estimer le niveau d'expression du gène. Plus le Ct est petit, plus le nombre de copies initiales de la cible est important, donc plus le gène est exprimé. Le Ct marque le début de la phase exponentielle de la courbe d'amplification représentant la fluorescence mesurée en fonction du nombre de cycles.

La précision et la fiabilité de la détection de l'échantillon dépendent de la spécificité des amorces. Une gamme étalon est préparée à partir d'un échantillon d'ADN connu (plasmide, ADNg). Une courbe étalon est établie afin de déterminer le pourcentage d'efficacité d'hybridation. Plus le pourcentage d'efficacité est proche de 100%, plus les amorces sont fiables (Annexe 6Annexe 7Annexe 8). Les courbes de fusion mesurées pour chaque amorce indiquent qu'un seul produit PCR a été amplifié, ce qui atteste la spécificité de l'amplification (Annexe 6Annexe 7 Annexe 8).

La réaction est réalisée avec le kit « SYBR qPCR Premix Ex Taq (Tli RNAseH Plus) d'Ozyme (Ref : TAKRR420W). Le mix réactionnel est préparé en mettant 10µL de tampon SYBR

Premix, 0,4µL du marqueur fluorescent ROX, 0,4µL d'amorce 10µM, 2µL d'ADNc (200ng) complété à 20µL avec de l'eau ultra-pure stérile. Trois répétitions de réaction sont réalisées. Les échantillons sont analysés dans un thermocycleur (Biorad, C1000 Touch) préprogrammé (95°C 10 min, 40 x (95°C 15sec ; 60°C 60sec)). Les données sont traitées avec le logiciel StepOne Software.

L'expression relative (RQ) du gène est calculée selon la méthode de Liu et Saint, 2002

$$\Delta Ct = Ct\ moy_{\text{ (gène d'intérêt)}} - Ct\ moy_{\text{ (gène de référence)}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{ (plante transformée)}} - \Delta Ct_{\text{ (Plante de référence)}}$$

$RQ = (E + 1)^{-\Delta\Delta Ct}$ où E est l'efficacité d'amplification

4.5.5 La digestion par des enzymes de restriction

La digestion enzymatique sert à tronquer le gène d'intérêt et le plasmide à des sites précis sur la séquence. La réaction se produit avec des enzymes de restriction Fast Digest® (FD) commercialisées par Thermofisher Scientific. Elle est très rapide du fait de la vélocité des enzymes. Les enzymes sont actives dans le même tampon, ce qui facilite les digestions multiples.

Les produits sont digérés en mettant 1µg de plasmide ou 0,15µg de produit PCR et 1µL de chaque enzyme FD dans 2µL du tampon FD 10x (le tampon de charge est déjà inclu dans le tampon Fast Digest® GreenBuffer) et en complétant à 20µL avec de l'eau ultra-pure stérile. Le mélange est incubé à 37°C pendant 5-15 minutes, puis les produits de digestion sont analysés sur gel.

4.6 Les techniques de clonage

4.6.1 Clonage dans le plasmide pCR8 *via* le système « TOPO TA cloning »

Le système TOPO® permet de cloner le produit PCR. La ligation du gène d'intérêt au plasmide se produit entre les nucléotides **T** présents sur le plasmide et les nucléotides **A** rajoutés par la *Taq* polymérase sur le produit PCR. C'est ce que l'on appelle le « TA cloning » (Figure 27).

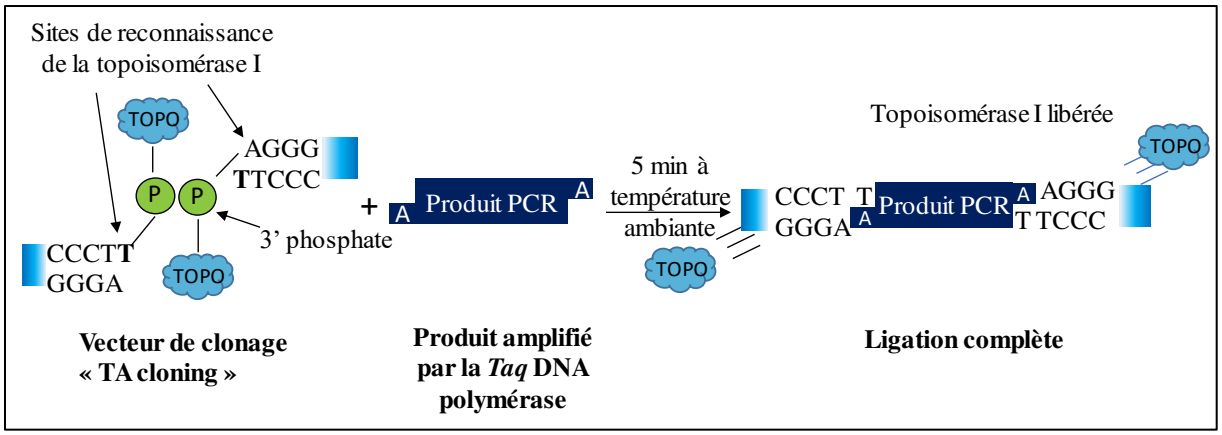


Figure 27 : Schéma représentatif de la ligation dans le pCR8 avec la méthode « TOPO TA cloning ».

La ligation s'effectue en ajoutant dans un tube 0,5µL de pCR8 (pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit, K2500-20SC (Invitrogen™), 0,5-1µL de solution saline, 0,5-4µL de produit PCR complété à 3µL avec de l'eau distillée stérile. Le mélange est homogénéisé délicatement et incubé pendant 5 minutes à température ambiante puis 5 minutes dans la glace pour arrêter la réaction. 1µL du produit de ligation est utilisé pour transformer les bactéries *E. coli* (Genhogs et MC1022) par électroporation (cf δ 4.8.1.2). La sélection des transformants se fait en présence de spectinomycine. Cette étape de clonage intermédiaire sert à multiplier le plasmide avant de cloner le gène dans le plasmide d'expression.

Ce plasmide peut être utilisé ensuite comme vecteur d'entrée pour transférer un gène vers un vecteur de destination de type Gateway® pour l'expression du gène d'intérêt dans n'importe quel système. Dans notre cas, nous avons réalisé le clonage dans le pGWB2-GW (cf δ 4.6.2.4).

4.6.2 Clonage des gènes d'intérêt dans le plasmide pET28b

4.6.2.1 Digestion enzymatique et déphosphorylation du plasmide pET28b

Le plasmide est d'abord digéré avec les mêmes enzymes qui ont coupé aux extrémités du gène d'intérêt (cf δ Tableau 12). Une étape de déphosphorylation est couplée simultanément à la digestion enzymatique pour éviter que le plasmide linéarisé ne se recircularise sur lui-même. Cette réaction est catalysée par la phosphatase alcaline qui va déphosphoryler les extrémités en 5' du plasmide.

En plus des réactifs de digestion, 1µL de phosphatase alcaline (Ref.18009027, Invitrogen™, Thermofisher Scientific) est ajouté et la réaction dure 30 minutes à 37°C.

4.6.2.2 Reconcentration du plasmide digéré

Le protocole utilisé comprend des étapes de centrifugation à 4°C à vitesse maximale (12400 xg). Aux 200µL du produit de digestion sont ajoutés 200µL de phénol-chloroforme. L'ensemble est vortexé pendant 30 secondes puis centrifugé pendant 10 minutes. La phase aqueuse (phase supérieure contenant l'ADN) est récupérée et transférée dans un nouveau tube auquel on ajoute du NaCl 200mM final, 2,5 volume d'éthanol absolu froid et 1µL de glycogène (Invitrogen™, 10814010). Après 1h d'incubation à -20°C, le mélange est centrifugé pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé et 1mL d'éthanol 70% froid sont ajoutés. L'ADN est culotté par une centrifugation de 10 minutes. L'éthanol est ensuite évaporé à 37°C jusqu'à séchage total puis est resuspendu dans 10µL d'eau ultra-pure stérile. Le plasmide digéré est sous forme linéaire, il migre donc plus vite que le plasmide non digéré de forme circulaire (Figure 28a).

4.6.2.3 Ligation des gènes d'intérêt dans le pET28b par la T4 DNA ligase

La ligation du gène d'intérêt s'effectue avec le kit « T4 DNA Ligase » (Ref.15224-041, Invitrogen™). La réaction est réalisée avec un ratio molaire insert : plasmide de 3 :1. Le volume réactionnel est composé de 5µL de plasmide déphosphorylé (3-30fmol), 10µL d'insert (9-90fmol), 4µL de tampon ligase 5x (250mM Tris-HCl pH7,6, 50mM $MgCl_2$, 5mM ATP, 5mM DTT, 25% p/v polyéthylène glycol-8000) et 1µL de la T4 DNA ligase (5U/µL). Après 18h d'incubation à 16°C, le produit de ligation est reconcentré comme précédemment (δ 4.6.2.2). Le produit de ligation apparaît comme un « smear » (trainée de bandes) au-delà de 3000pb (Figure 28b).

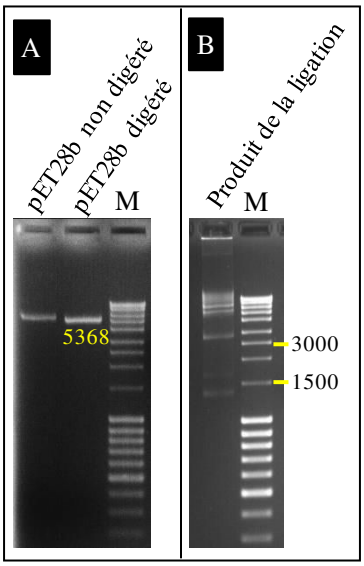


Figure 28 : Etapes conduisant au clonage du gène d'intérêt dans le pET28b. A : plasmide pET28b digéré et non digéré. B : produit de ligation.

Le clonage initial de l'ADN d'intérêt dans le vecteur pET28b s'effectue dans des souches d'*E. coli* comme MC1022 ou Genehogs (cf δ 1.2.1.1) utilisées pour multiplier et maintenir le nombre de copies du plasmide recombiné. Des bactéries optimisées pour l'expression des protéines recombinantes (BL21, Rosetta 2) sont ensuite transformées par choc thermique.

4.6.2.4 Clonage dans le plasmide pGWB2-GW

La technologie Gateway est basée sur une recombinaison site-spécifique pour un clonage directionnel. Le fragment d'ADN, bordé par les sites *att*, va être transféré du vecteur d'entrée au vecteur de destination sous l'action de la LR clonase (Figure 29). Le plasmide ayant reçu le gène d'intérêt devient alors le vecteur d'expression. Le mécanisme de recombinaison est illustré dans la Figure 29.

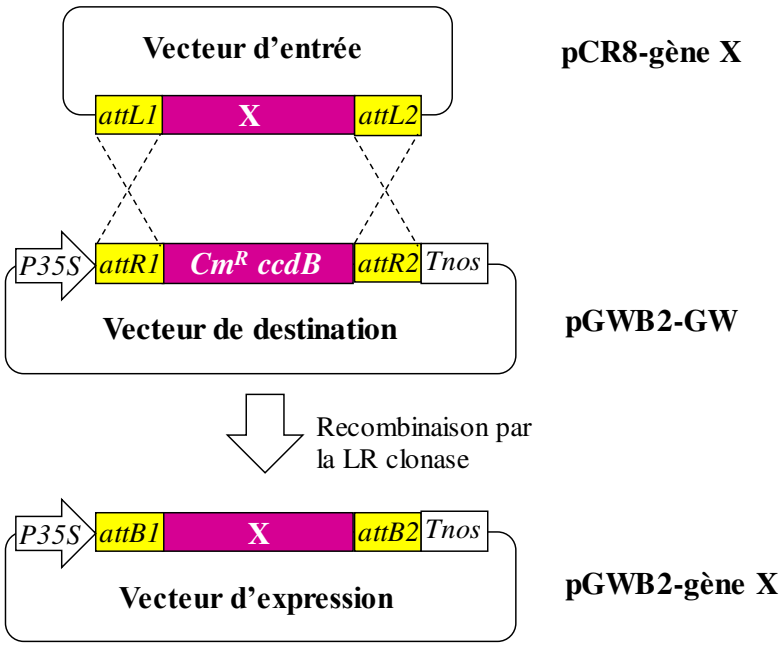


Figure 29 : Représentation schématique du clonage en système binaire du gène d'intérêt entre le pCR8 et le plasmide de destination pGWB2-GW.

Lors de la recombinaison, le gène *ccdb* étant toxique pour la cellule, va être remplacé par le gène d'intérêt. Seules les bactéries ayant incorporé le plasmide recombinant (qui ne possèdent plus le gène *ccdB*) pourront se développer.

La ligation a été réalisée en suivant le protocole fourni par le kit « LR clonase™ » (Ref. 11791043, Invitrogen™). Dans un tube de 1,5mL, 50ng de pCR8 sont mis en présence avec 150ng de pGWB2-GW et 2µL de LR clonase™. Le mélange est ensuite incubé 1h à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant 1µL de protéinase K (2µg/µL) et en incubant pendant 10 minutes à 37°C.

4.7 Le séquençage du gène

Le séquençage est sous-traité par la société Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne).

4.8 La transformation d'*E. coli*

4.8.1 Transformation par choc électrique

4.8.1.1 Obtention d'*E. coli* électro-compétentes

Ce protocole comprend des étapes de centrifugation qui s'effectuent pendant 15 minutes à 4000xg à 4°C sans frein et sans accélération. A partir d'un stock glycérol de bactéries, 2mL de LB stérile sont ensemencés puis mis sous agitation à 37°C pendant 24h. Un mL de la préculture est transféré dans 100mL de LB. La culture est incubée sous agitation (200rpm) à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{600} de 0,7 pour être en phase exponentielle de croissance (environ 3h). La culture est ensuite placée sur de la glace durant 30 minutes puis centrifugée. Le culot est resuspendu délicatement dans 20mL d'eau ultra pure froide et stérile. Les bactéries sont ensuite centrifugées puis lavées à nouveau. Après le dernier lavage, le culot est resuspendu dans 20mL de glycérol 10% froid stérile puis centrifugé. Les bactéries compétentes sont resuspendues dans 1mL de glycérol 10%, aliquotées (40µL) et congelées dans l'azote liquide avant d'être stockées à -80°C. Les bactéries sont alors compétentes pour une transformation par choc électrique.

4.8.1.2 Le choc électrique ou électroporation

Cette méthode de transformation repose sur le transfert de l'ADN dans les bactéries rendues électro-compétentes sous l'action d'un champ électrique très court ce qui va déstabiliser la membrane cellulaire et faciliter la pénétration du plasmide dans la cellule.

Pour réaliser cette opération, un aliquot de 40µL de bactéries électro-compétentes stockées à -80°C est transféré dans la glace. Une fois décongelées, les bactéries sont mises en contact avec 1 à 10ng de plasmide ou de produit de ligation. Le tout est transféré dans une cuve d'électroporation (2mm de séparation entre les deux électrodes) et mis dans un pulseur (Biorad micropulseur™, V= 2,5 kV ; R=200 Ω ; C = 25 µF ; EcI) pour appliquer le choc électrique. Les bactéries sont rapidement resuspendues dans 500µL de milieu LB stérile et placées à 37°C pendant 1 heure avant d'être étalées sur un milieu sélectif contenant les antibiotiques auquel le plasmide intégré confère la résistance.

4.8.2 Transformation par choc thermique

4.8.2.1 Obtention d'*E. coli* chimio-compétentes

Une colonie d'*E. coli* est transférée dans 20mL de LB liquide sans antibiotique de sélection. La culture est placée pendant une nuit à 37°C. Un mL de cette préculture est utilisé pour ensemencer 50mL de milieu LB pour les remettre en culture. Lorsque la DO_{600} atteint 0,5, les bactéries sont centrifugées à 4000 xg pendant 10 minutes à 4°C sans frein et sans accélération. Le culot est repris délicatement dans 10mL de solution de $CaCl_2$ stérile à 100mM. Une dernière centrifugation à 4000 xg pendant 10 minutes permet de culotter les bactéries qui sont ensuite resuspendues dans 1mL de $CaCl_2$. Les bactéries sont alors laissées dans la glace pendant 1 heure avant d'être utilisées pour une transformation par choc thermique.

4.8.2.2 Le choc thermique

Le choc thermique consiste à faire subir à la cellule un changement de température bref et fort ce qui rend la membrane plasmique momentanément perméable (formation transitoire de micropores) permettant à l'ADN plasmidique de rentrer dans la cellule.

Pour ce faire, 1 à 5µl de construction plasmidique (à 1ng/µL) est ajouté à un aliquot de 100µL de bactéries rendues chimio-compétentes (cf δ 4.8.2.1). L'ensemble est homogénéisé délicatement puis remis dans la glace pendant 30 minutes. Au bout de ce temps, les cellules vont subir un choc thermique par un passage de 42°C pendant 45 secondes à une incubation dans la glace pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite remises à une température normale de croissance (37°C) dans 500µL de LB pendant 30 minutes. Un aliquot de 100µL est étalé sur LB solide contenant les antibiotiques adéquats.

4.9 La transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* par choc thermique

4.9.1 Préparation des Agrobactéries chimiocompétentes

Les Agrobactéries disponibles en stock glycérol sont étalées sur une boîte de Pétri contenant du milieu YEB solide supplémenté des antibiotiques adéquats (Tableau 10 ; Figure 26). Les boîtes sont placées à 28°C pendant 3-4 jours. Une colonie est prélevée et suspendue dans 2 mL de milieu YEB avec les mêmes antibiotiques. Après une incubation sous agitation (200 rpm) à 28°C toute la nuit, cette préculture est transférée dans 50mL de milieu YEB (contenant toujours les antibiotiques) et cultivée jusqu'à ce que la densité optique (λ = 595nm) soit de 0,7+/- 0,1 (environ 3-4 heures). La culture est ensuite centrifugée à 3000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le culot d'Agrobactéries est resuspendu dans 5mL de tampon TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH8) stérile et froid. La suspension est centrifugée 5 minutes à 3000 xg à 4°C. Ce culot

est ensuite repris délicatement dans 5mL de YEB *et al*iquoté en volume de 500µL que l'on peut directement utiliser ou conserver à -80°C dans 10% de glycérol.

4.9.2 Application du choc thermique

La transformation est réalisée à partir d'un aliquot d'Agrobactéries chimio-compétentes préparées selon le protocole décrit précédemment (cf δ 4.9.1). Dans cet aliquot, 0,5 à 1µg de plasmide binaire (pGWB2) recombinant est ajouté et l'ensemble est mélangé délicatement. Pour effectuer le choc thermique, les cellules sont plongées pendant 30 secondes dans l'azote liquide puis dans un bain-marie à 37°C pendant 5 minutes. La transformation est terminée par un repos de 30 minutes dans la glace. A la suspension bactérienne est ajouté 1mL de milieu YEB que l'on incube à 28°C pendant 2h pour permettre de relancer la croissance. Après cette régénération, un aliquot de 200µL est étalé sur un milieu YEB solide contenant les antibiotiques appropriés y compris l'antibiotique auquel le plasmide recombinant doit conférer la résistance afin de sélectionner les bactéries transformées. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3-4 jours jusqu'à l'apparition de colonies blanches d'environ 4mm de diamètre.

5 Les outils de production et d'analyse de protéines

5.1 Induction de l'expression de la protéine recombinante à l'ITPG chez *E. coli*

Vingt mL de milieu LB liquide stérile additionné des antibiotiques de sélection (Tableau 10) sont ensemencés avec une colonie de bactérie recombinante et incubée 18h à 37°C. 2mL de la préculture sont transférés dans 200mL de LB frais avec les mêmes antibiotiques. La culture est incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO_{600} = 0,6 contrôlée au spectrophotomètre par rapport au milieu LB non inoculé. L'IPTG est ajouté dans le milieu à 1mM final pour induire l'expression de la protéine recombinante. L'induction est effectuée pendant 20h à 18°C. La culture est ensuite transférée dans 4 tubes de 50mL. Les bactéries sont culottées par centrifugation à 4000 xg pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et chaque culot est resuspendu dans 1mL de tampon de lyse froid. La composition du tampon dépend de l'utilisation finale : NaPi 0,1M pH7 pour réaliser un extrait brut ou NaPi 10mM pH8 si la protéine doit être purifiée par chromatographie d'affinité Ni-NTA. Si le culot n'est pas immédiatement utilisé, il peut être conservé à -20°C.

5.2 Extraction des protéines totales d'*Escherichia coli*

5.2.1 Lyse des cellules par broyage à l'azote

Le culot en suspension est versé goutte à goutte dans un mortier et broyé dans l'azote liquide avec un pilon. Le lysat est transféré dans un tube de 2mL et centrifugé à 12400 xg pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et constitue l'extrait brut contenant les protéines totales.

5.2.2 Lyse des cellules par sonication

Les cellules sont lysées par sonication (3 fois 30 secondes à des intervalles de 30 secondes d'arrêt) à l'aide d'un sonicateur (Bandelin SonoPlus HD 2070) programmé (5 cycles, puissance 40%) et d'une sonde MS73 à une intensité de 200W/cm^2. La sonde est plongée dans le liquide maintenu à froid dans de la glace. Le lysat est centrifugé pendant 15 minutes à 16000 xg à 4°C afin de précipiter les débris cellulaires et les protéines insolubles. Le surnageant contenant les protéines solubles dont les protéines cibles (4CL et HCT) constitue l'extrait brut et peut être purifié et dessalé par la suite.

5.3 Purification de la protéine d'intérêt en conditions natives

5.3.1 Les solutions tampon

Les solutions tampon jouent un rôle majeur dans la purification des protéines car elles permettent d'isoler la protéine d'intérêt en fonction de ses propriétés physiques. L'objectif de la purification est de conserver la plus grande quantité de protéines fonctionnelles avec moins de contaminants (sels, débris cellulaires par exemple) possibles. Ces tampons contiennent des sels utilisés comme stabilisateurs ioniques. Les sels permettent d'augmenter la solubilité de la protéine. La composition des tampons est indiquée dans le Tableau 20.

	Nom	Utilisation	Composition
Tampon de lyse	NaPi 0,1M pH7	Extrait brut protéique, tampon de dessalage sur colonne G25.	A partir des solutions stock à 1M: mélanger 57,7mL de $NaHPO_4$ + 42,3mL de NaH_2PO_4.
	NPI-10 pH8	Purification sur colonne d'affinité contre l'étiquète histidine	50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl, 10 mM imidazole, pH8
Tampon de lavage	NPI-20	Purification sur colonne spin Ni-NTA	50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl, 20 mM imidazole, pH8
Tampon d'élution	NPI-500	Purification sur colonne spin Ni-NTA	50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl, 500 mM imidazole, pH8
	NPI-250	Purification en Batch Ni-NTA	50mM NaH_2PO_4, 300mM NaCl, 250 mM imidazole, pH8

Tableau 20 : Composition des solutions tampon utilisées pour la purification des protéines « his-taggées » par chromatographie d'affinité et le dessalage.

5.3.2 Purification par chromatographie d'échange cationique

5.3.2.1 Purification sur colonne spin Ni-NTA

La chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA permet de purifier les protéines fusionnées à une étiquette poly-histidine (His^6-tag). La phase stationnaire est une matrice d'agarose réticulée greffée au ligand Ni-NTA. Les résidus histidine chargés négativement (à pH8) se lient sur les ions Ni^{2+} ce qui va retenir la protéine d'intérêt. L'élution se fait en augmentant la force ionique avec des concentrations croissantes en imidazole dans le tampon (Tableau 20). Les rendements moyens obtenus avec des résines Ni-NTA sont entre 5 et 10mg/mL.

Les protéines recombinantes his-taggées sont purifiées selon les recommandations de Qiagen (Ni-NTA Spin Kit). Le culot obtenu après centrifugation (1minute, 15000 xg) de 1mL de culture bactérienne (cf δ 5.1) est solubilisé dans 630mL de tampon de lyse NPI-10 (Tableau 20). 70µL de lysozymes (10mg/mL) sont ajoutés et le tout est incubé sur la glace pendant 15-30 minutes. Au bout de ce temps, le lysat est centrifugé à 15000xg pendant 10 minutes à 4°C. 600µL de surnageant sont déposés sur la colonne Ni-NTA pré-équilibrée (ajout de 600µL de tampon NPI-10 et centrifugation pendant 2 minutes à 1000xg). Les protéines non fixées à la matrice Ni-NTA sont éliminées par une centrifugation de 5 minutes à 1000xg. La colonne est lavée 2 fois avec 600µL de tampon NPI-20 et une centrifugation de 2 minutes à 8000xg entre chaque lavage. La protéine recombinante « his-taggée » est ensuite éluée par trois passages de 300µL de tampon NPI-500 espacées par des centrifugations de 2 minutes à 8000xg. Les fractions collectées sont ensuite dosées au Qubit (cf. δ 4.2) et analysées en SDS-PAGE.

5.3.2.2 Purification sur colonne His-Trap HP

Ce système fonctionne sur le même principe que la purification sur colonne spin Ni-NTA et permet de purifier jusqu'à 5mL d'extrait brut. La colonne His-Trap HP, constituée de sépharose saturée en Nickel, est commercialisée par GE Healthcare Life Sciences. Le protocole débute par une phase d'équilibre de la colonne avec 5mL de tampon NPI-10 (Tableau 20). 2mL d'extrait brut sont déposés sur la colonne qui est ensuite lavée avec 3mL de tampon NPI-20 afin d'éliminer les contaminants. La protéine recombinante est éluée avec 2,5mL de NPI-500.

5.3.2.3 Purification en système Batch

Dans la mesure où les systèmes précédents ne sont pas adaptés à des volumes supérieurs à 5mL, il a donc été nécessaire de mettre au point un protocole permettant de purifier en une seule fois 15mL d'extrait brut. Le système Batch se prête à des purifications sur des extraits pouvant être 10 fois concentrés (culot issu de 40mL de culture bactérienne repris dans 4mL de tampon de lyse) sans nécessité d'utiliser une colonne. La matrice Ni-NTA est composée de billes d'agarose pouvant être mises en solution dans le tampon NPI-10. Nous avons donc suivi les indications du kit Qiagen « The QIA expressionist, Batch Purification of 6xHis tagged proteins from *E. coli* under native conditions ». 3,75mL de la matrice en suspension sont mélangés avec 15mL de l'extrait brut. Le mélange est mis sous agitation à 200rpm à 4°C pendant 1 heure puis centrifugé 10 minutes à 12000 xg. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé 2 fois avec 8 mL de tampon NPI-20 et centrifugé après chaque lavage. La protéine recombinante « his-taggée » est éluée avec 2,5mL de tampon NPI-250 (Tableau 20).

A la fin de la purification, la concentration en sels est très élevée après élution avec 250 ou 500mM d'imidazole. De plus, le fait d'éluer avec de grands volumes conduit à des rendements très faibles. La présence des sels peut entraîner un encombrement stérique autour de la protéine et par conséquent gêner son interaction avec les autres molécules. Pour y remédier, il faut procéder par un dessalage et une reconcentration de la protéine.

5.3.3 Dessalage et concentration

5.3.3.1 Les colonnes Sephadex™ G-25

La chromatographie d'exclusion permet de séparer les protéines globulaires (entre 1000 et 5000Da) en fonction de leur poids moléculaire (à force ionique et pH constant). La colonne Sephadex™ G-25 est présentée sous la forme d'un gel de filtration. L'indice G-25 indique la granulométrie des billes de gel (50-150µm), permettant de séparer les biomolécules (ayant un poids moléculaire d'au moins 5000Da) des petites molécules. Les molécules de taille inférieure

à 5000Da comme les sels sont totalement retardées dans le gel tandis que les biomolécules au-delà de 5000Da comme les protéines sont exclues et sont éluées dans le volume d'exclusion.

Le gel de filtration (Ref. 17-0032-01, GE Healthcare Life Sciences) est coulé dans une colonne pour un volume de 5mL. Ce système peut dessaler jusqu'à 2,5mL d'extrait. La colonne est conditionnée au préalable avec 5mL de NaPi0,1M pH7 (Tableau 20). Pour procéder au dessalage, 2-2,5mL d'échantillon sont chargés avec une seringue sous pression sur la colonne suivie de 10mL de tampon NaPi 0,1 pH7. Plusieurs fractions de 0,5mL sont collectées et sont analysées au spectrophotomètre à 280nm. Les fractions les plus concentrées sont assemblées puis analysées en SDS-PAGE.

5.3.3.2 Les colonnes Centricon de 10 kDa

Ce produit est distribué par Merck Millipore. Le système Centricon est constitué d'un filtre Amicon Ultra-15 inséré dans un tube de centrifugation de 50mL. Cette technique est employée pour concentrer des protéines diluées ou pré-purifiées issues d'éluats de colonnes. Il peut également servir au dessalage. La membrane de 10 kDa permet de retenir les protéines de poids moléculaire au-delà de cette limite. 10mL de l'extrait dilué sont déposés sur le filtre. Le tube est mis à centrifuger à 5000 xg pendant au moins 20 minutes à 4°C jusqu'à concentrer 4 fois l'extrait. L'extrait peut être redilué avec le tampon NaPi 0,1M pH7 et repassé plusieurs fois sur la colonne afin de diminuer la concentration en imidazole. Le volume retenu par la colonne est ensuite récupéré. Les différentes fractions obtenues lors des concentrations sont analysées sur gel SDS-PAGE. La protéine purifiée et reconcentrée est quantifiée à l'aide du Qubit (cf δ 4.2).

5.4 Séparation des protéines totales par SDS-PAGE

L'analyse SDS-PAGE permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire sous l'influence d'un champ électrique. Les protéines sont donc soumises à un traitement de dénaturation de la manière suivante : x µL d'échantillon sont mélangés à x µL de tampon de charge 2x (Tris HCl 125mM pH6,8, SDS 5%, glycérol 20%, β-mercaptoéthanol 5% ; bleu de bromophénol 0,05%). Le β-mercaptoéthanol rompt les ponts disulfure ce qui va entraîner le déroulement de la protéine. Le SDS recouvre uniformément la protéine de charges négatives. L'extrait est chauffé à 100°C pendant 10 minutes.

Les échantillons dénaturés sont déposés sur un gel de polyacrylamide préparé en 2 phases comme indiqué dans le Tableau 21. Le gel de concentration permet de concentrer les échantillons au même niveau. Le gel de résolution est la zone de migration des protéines qui vont être séparées plus ou moins vite selon leur poids moléculaire. Le TEMED et le persulfate déclenchent la polymérisation du gel dès lors qu'ils sont ajoutés. Le gel polymérisé est ensuite

placé dans une cuve remplie du tampon de migration (190mM glycine, 25mM Tris HCl pH8, 0,1% SDS). La migration se fait pendant 1h30 à 100V.

La révélation s'effectue en présence du bleu de Coomassie. Ce réactif sert de marqueur par sa capacité à se lier aux protéines. Le gel est immergé dans le bain de Coomassie (Coomassie Brillant Blue G-250 0,1% p/v, 45% éthanol, 5% acide acétique) pendant 1h à température ambiante sous agitation douce, puis dans un bain de décoloration (acide acétique 10%, méthanol 20% ; H_2O 70%) pendant 1h. Après rinçage à l'eau distillée, les protéines sont visualisées sous forme de bandes bleues. Un marqueur de taille (SM0441, Fermentas, Thermofisher Scientific) migre en parallèle et donne le poids moléculaire apparent de la protéine.

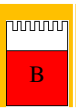
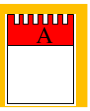
Réactif	**Gel de résolution 10% (B)** 	**Gel de concentration (A)** 
Acryl 30% mix	3,3mL	0,83mL
Tris HCl 1M	3,75mL, **pH8,8**	0,63mL, **pH6,8**
H_2O distillée	2,79mL	3,4mL
SDS 10%	100µL	50µL
TEMED	8µL	5µL
Persulfate 25%	40µL	20µL

Tableau 21 : Protocole de préparation du gel SDS-Page.

5.5 Détection immunologique par Western Blot des protéines His-taggées

L'analyse en Western Blot permet la détection et l'identification de la protéine d'intérêt grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. La détection immunologique se déroule en deux étapes. Dans un premier temps, un anticorps primaire se fixe à la protéine par reconnaissance spécifique d'un marqueur lié à la protéine cible. Dans le cadre de ce travail, cet anticorps est dirigé contre l'étiquette poly-histidine (His^6-tag) fusionnée à l'extrémité C-terminale de la protéine.

Dans un deuxième temps, l'anticorps primaire est reconnu spécifiquement par un autre anticorps. Cet anticorps dit « secondaire » est couplé à une phosphatase alcaline capable de transformer le NBT (Nitro Blue tétrazolium chloride) et le BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate *p*-toluidine) en un produit violet.

Cette méthode requiert la technique du SDS-PAGE pour séparer les protéines. Toutes les étapes se déroulent à température ambiante sous agitation douce. Les protéines sont électro-transférées depuis le gel SDS-PAGE sur une membrane PVDF (Polyvinylidène difluoride, GE Healthcare Amersham-P) préalablement imbibée à l'éthanol puis dans le tampon de transfert (190mM

glycine, 25mM Tris HCl pH8, 0,1% SDS, éthanol 20%). Le gel en contact avec la membrane est soumis à un champ électrique dans le tampon de transfert. Le transfert s'effectue pendant 45 minutes à 80V. A la fin du transfert, la membrane imprégnée des protéines est rincée 5 minutes dans du PBS-Tween (150mM NaCl, 1,4mM KH_2PO_4, 10mM Na_2HPO_4, 2,7mM KCl, 1% v/v Tween 20) puis immergée pendant 10 minutes à température ambiante dans du PBS-Tween supplémenté de 5% de lait en poudre afin de bloquer les sites aspécifiques entre la membrane et les anticorps. Le même bain est renouvelé en mettant en présence la membrane avec l'anticorps primaire (Novex®, Life Technologies, Ref. 46-0693) dilué au 1/5000ème. L'incubation est réalisée à température ambiante pendant 2 heures. Au bout de ce temps, la membrane est rincée 3 fois pendant 10 minutes au PBS-Tween avant d'être incubée pendant 1h30 dans un bain PBS-Tween en présence de l'anticorps secondaire (Sigma-Aldrich, Ref. A3563) dilué au 1/2000ème. Après un rinçage et 2 lavages de 20 minutes dans du PBS-Tween, la membrane est rincée 2 fois 10 minutes dans du tampon Tris-NaCl (Tris 0,1M Ph 9,6, 0,1M NaCl). Puis la révélation se fait en ajoutant à ce dernier tampon 0,375% de BCIP et 0,5% de NBT à l'obscurité. Les tâches correspondant aux protéines « His-taggées » commencent à apparaître au bout de quelques minutes.

6 Les outils de culture *in vitro* (CIV)

6.1 Pratique de la culture *in vitro*

La culture *in vitro* nécessite de travailler dans un environnement stérile. Pour ce faire, les étapes de manipulation se déroulent sous une hotte à flux laminaire vertical ou horizontal. Le plan de travail est désinfecté à l'éthanol 70%. Différentes méthodes de stérilisation sont adaptées au matériel solide et liquide. Les milieux et la verrerie (pots en verre, boîte de Pétri en verre, bouteilles Schott) sont stérilisés par autoclavage (120°C, 20 min, 1bar). Les outils métalliques (pinces, scalpels) sont stérilisés préalablement au four Pasteur (1h, 80°C) et sont flambés à l'éthanol 96% avant chaque manipulation. Les milieux sont préparés dans de l'eau distillée afin que les milieux soient de composition exacte. Les solutions stock d'antibiotiques et de phytohormones sont diluées dans l'eau distillée stérile et filtrées à 0,2µm puis stockées à -20°C.

6.2 Le milieu de culture de base

6.2.1 Le milieu MS (Murashige and Skoog)

C'est le milieu de base utilisé pour la culture des plantes *in vitro*. Sa composition est décrite en Annexe 11. Ce milieu est disponible commercialement sous la forme de poudre (Ref. M0221, Kalys) contenant tous les éléments à l'exception des régulateurs de croissance, du sucre et de l'agar. Le pH est ajusté à pH 5,8 avant passage à l'autoclave.

6.2.2 Les éléments ajoutés au milieu MS (Murashige et Skoog, 1962)

Le milieu MS de base est additionné de vitamines, de 3% de saccharose et de 7,5 g/L d'agar pour un milieu solide. D'autres composants peuvent être ajoutés pour la préparation de milieux spécifiques, comme certaines hormones végétales. Les milieux de sélection sont additionnés des antibiotiques appropriés après autoclavage. Les additifs et leurs concentrations sont récapitulés dans le Tableau 22.

<table>
<tr><th colspan="2"></th><th colspan="2">Composé</th><th>Référence et fournisseur</th><th>Concentration stock</th><th>Concentration finale dans le milieu</th></tr>
<tr><td rowspan="4">Vitamines</td><td rowspan="3">Avec source d'azote</td><td>Acide nicotinique</td><td>N0761, Sigma-Aldrich[a]</td><td>100 mg/L</td><td>1 mg/L</td></tr>
<tr><td>Pyroxidine HCl</td><td>V-018, Sigma-Aldrich[a]</td><td>100 mg/L</td><td>1 mg/L</td></tr>
<tr><td>Thyamine HCl</td><td>T1270, Sigma-Aldrich[a]</td><td>1000 mg/L</td><td>10 mg/L</td></tr>
<tr><td>Sans source d'azote</td><td>Myo-inositol</td><td>I7508, Sigma-Aldrich[a]</td><td>10000 mg/L</td><td>100 mg/L</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Hormones végétales</td><td>Type de cytokinines</td><td>NAA (acide 1-naphtalène acétique)</td><td>N0903, Kalys[b]</td><td rowspan="2">1 g/L dans NaOH 1N</td><td>0,1 mg/L</td></tr>
<tr><td>Type de d'auxines</td><td>6-BAP (6-benzylazminopurine)</td><td>B0904, Kalys[b]</td><td>0,5 mg/L</td></tr>
<tr><td colspan="3">Source de carbone</td><td>Saccharose</td><td>84100, Sigma-Aldrich[a]</td><td></td><td>30 g/L</td></tr>
<tr><td colspan="3">Agent d'élimination des agrobactéries</td><td>Céfotaxime</td><td>C0111, Kalys[b]</td><td rowspan="2">100 mg/L dans dH_2O</td><td>250 mg/L</td></tr>
<tr><td colspan="3">Agent de sélection des plantes transformées</td><td>Hygromycine</td><td>H0192, Kalys[b]</td><td>35 mg/L</td></tr>
</table>

Tableau 22 : Composants ajoutés au milieu de base après stérilisation. a : St-Louis MO, USA; b: Bernin, France.

6.3 La mise en germination des graines de tabac

Les graines de tabac sont stérilisées par un bain de 30 secondes dans l'éthanol 95%, un bain de 5 minutes dans de l'eau distillée stérile supplémentée de 2% de chlore actif (eau de Javel à 2% de chlore actif), et 3 bains de 5 minutes afin d'éliminer le surplus d'eau de Javel. Les graines sont ensuite transférées sur le milieu de germination solide en boîte de Pétri, dont la composition est la suivante : le milieu minéral MS, les vitamines MS diluées deux fois par rapport à la solution stock (Tableau 22), 30g/L de saccharose, 7,5 g/L d'agar HP696 à pH5,8. Les graines de tabac commencent à germer généralement au bout de deux semaines. Les plantules sont ensuite placées individuellement sur un milieu MS solide supplémenté de sucre préalablement coulé dans des pots en verre stériles (pots de 200mL V0633, avec couvercle Magenta^{TM} B8648, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Les plantes obtenues *in vitro* (ou *vitro* plants) et les boîtes de Pétri sont mis en culture en phytotron, sous 40% d'humidité relative et 160 µmol/m^2.s^{-1} d'intensité lumineuse, avec une photopériode jour/nuit de 16h/8h. La température est ajustée à 25°C le jour et à 20°C la nuit.

6.4 La transformation génétique du tabac *via Agrobacterium tumefaciens*

6.4.1 Les milieux de culture

Nom du milieu	Composition
Milieu de resuspension (MR) des agrobactéries	MS (x1), Vitamines (x1), 3% de saccharose. pH=5,8
Milieu de co-culture (CO)	MS (x1), Vitamines (x1), 3% de saccharose, 0,5 mg/L de 6-BAP et 7,5 g/L d'agar HP696. pH=5,8
Milieu liquide (ML) d'élimination d'agrobactéries	MS (x1), Vitamines (x1), 3% de saccharose, 250 mg/L céfotaxime. pH=5,8
Milieu de sélection (SE) des cellules végétales transformées	MS (x1), Vitamines (x1), 3% de saccharose, 0,5 mg/L de 6-BAP, 250 mg/L céfotaxime, 35 mg/L d'hygromycine et 7,5 g/L d'agar HP696. pH=5,8
Milieu d'enracinement (ME) des plantules transformées génétiquement	MS (x1), Vitamines (x1), 3% de saccharose, 0,1 mg/L de NAA, 250 mg/L céfotaxime, 35 mg/L d'hygromycine et 7,5 g/L d'agar HP696. pH=5,8

Tableau 23 : Composition des milieux utilisés pour la transformation génétique du tabac médiée par Agrobacterium tumefaciens.

Chaque milieu est composé du milieu de base MS additionné de vitamines et de saccharose. Certaines hormones sont ajoutées pour améliorer la régénération des plantes. La présence

d'antibiotiques permet de sélectionner et de maintenir le gène d'intérêt dans le génome. La composition des milieux est indiquée dans le Tableau 23.

6.4.2 Le protocole de transformation

	Etape de transformation	Matériel biologique
Etape 1	**Préparation de l'inoculum bactérien**	- Incubation des Agrobactéries modifiées dans 30 mL de milieu YEB liquide stérile additionné des antibiotiques appropriés. Culture sous agitation pendant 36h à 28°C. - 4h avant infection: ajout de 0,1 mM d'acétosyringone pour activer la virulence de la bactérie. - Dès que DO (595nm) = 0,7+/-0,1, centrifugation à 1500 xg pendant 15 minutes à température ambiante. - Resuspension du culot dans 30 mL de YEB frais stérile. - Renouvellement du lavage deux fois avec 30 mL de YEB (au total 3 lavages) pour éliminer le reste d'antibiotiques. - A la dernière centrifugation, élimination du surnageant et homogénéisation du culot dans 30 mL de milieu de resuspension (tableau 24).
Etape 2	**Infection d'explants foliaires par *Agrobacterium tumefaciens***	- Découpage de feuilles de *vitro* plants pour obtenir des rectangles de 1 cm de longueur. - Immersion des explants foliaires 1 minute dans la suspension bactérienne et séchage sur un papier filtre stérile pour enlever le surplus de bactéries.
Etape 3	**Coculture des bactéries avec les explants foliaires**	- Transfert des explants sur un milieu de co-culture (tableau 24) et incubation 2 jours à 23°C à la lumière.
Etape 4	**Elimination des Agrobactéries**	- Immersion des explants foliaires pendant 10 minutes dans le milieu ML liquide en présence de céfotaxime pour éliminer les bactéries. - Absorption du surplus de liquide sur du papier filtre stérile.
Etape 5	**Sélection et régénération des plantes entières et**	- Disposition des explants sur milieu SE (tableau 24) en présence de l'antibiotique de sélection. En présence de 6-BAP, des tiges feuillées génétiquement transformées vont se développer sous pression de sélection à l'antibiotique dès 3 semaines après transformation. - Repiquage des jeunes plantules (taille d'environ 5 cm) sur milieu ME (tableau 24). Ce milieu est supplémenté d'un analogue de l'AIA, le NAA pour induire les racines.

Tableau 24 : Etapes de la transformation génétique du tabac via Agrobacterium tumefaciens depuis l'infection d'un explant foliaire jusqu'à la régénération d'une plante génétiquement transformée avec le gène d'intérêt.

La plante qui a intégré le plasmide recombiné va présenter une résistance à l'hygromycine, ce qui permettra de sélectionner les plantes transformées.

Le protocole de transformation a été adapté d'une publication (Gallois et Marinho, 1995) par Dr. Sissi Miguel (S. Miguel, thèse 2013), en prenant comme matériel végétal des explants foliaires de *vitro* plants de tabacs. Les étapes de la transformation se déroulent comme indiquées dans le Tableau 24.

Plusieurs séries de transformations sont réalisées pour obtenir des événements de transformation indépendants. Pour chaque série de transformation, au moins 3 plantes par construction sont transformées.

6.4.3 Caractérisation des plantes transgéniques

La présence du gène d'intérêt doit être vérifiée sur les plantes résistantes à l'hygromycine. Les ADN génomiques sont extraits à partir de jeunes feuilles et une PCR est réalisée avec les amorces spécifiques du gène d'intérêt présentées dans le Tableau 14. L'expression du gène est vérifiée par une analyse de qPCR à partir des plantes révélées positives par la première PCR (Tableau 18).

6.4.4 Préparation des cultures cellulaires

6.4.4.1 Initiation des cals et mise en suspension liquide

L'induction des cals est contrôlée par un équilibre hormonal qui dépend de l'espèce végétale et du tissu considéré. Les teneurs en auxine et cytokinines nécessaires à l'initiation des cals à partir de feuilles de tabac ont été adaptées à partir du protocole de Vasilev *et al.*, 2014. Pour ce faire, des explants foliaires de tabac sont déposés sur un milieu MS solide contenant les vitamines et le sucre et supplémenté de 0,1mg/L de 6-BAP et 0,8mg/mL de NAA. La pression de sélection des cellules transformées est maintenue en présence d'hygromycine (35mg/L). Les cals commencent à se former au bout de 3 semaines et ont un aspect friable. Nous avons prélevé les cals après 6 semaines. Un gramme de cals est transféré dans des erlenmeyers contenant 100mL de milieu MS avec les mêmes teneurs en agents de croissance et antibiotiques. Les suspensions cellulaires sont maintenues sous agitation rotatoire à 200rpm à 25°C à l'obscurité et des sous-cultures sont préparées toutes les 2 semaines en renouvelant le milieu de culture.

6.4.4.2 Vérification de la viabilité des cellules végétales et mesure de la densité cellulaire

Les cellules végétales sont observées au microscope (Obj x40) afin, d'une part, de contrôler la viabilité des cellules et, d'autre part, de vérifier l'absence de contamination par des micro-organismes. La suspension cellulaire est homogénéisée v/v avec une solution de bleu de Trypan préparée à 0,04% p/v dans une solution de PBS (NaCl 140mM, KH_2PO_4 4,4mM). Ce colorant pénètre uniquement dans les cellules mortes et les colore en bleu ce qui les distingue des cellules vivantes.

6.4.5 Mesure des paramètres de culture

Le pH du milieu est mesuré à l'aide d'une bandelette de papier pH universel (1-14). Toutes les cultures ont un pH égal à 6 en présence ou en l'absence d'acide chlorogénique. 5mL de la culture sont prélevés et déposés sur un papier filtre Whatman n°1 et la biomasse de cellules fraîches est collectée par filtration sous dépression (40 sec, 800mBar) sur un filtre Büchner. Les cellules sont pesées et la teneur en biomasse fraîche est déterminée par rapport au volume prélevé. Ces données nous permettent de calculer le taux de croissance cellulaire avec la formule suivante :

$$\text{Taux de croissance } (\%) = \frac{\text{Biomasse fraîche mesurée} - \text{biomasse fraîche initiale}}{\text{biomasse fraîche initiale}} \times 100$$

Les cellules (environ 1g de matière fraîche) sont ensuite séchées à 50°C pendant 20 minutes puis pesées à nouveau afin de déterminer la teneur en matière sèche.

7 Les tests enzymatiques et l'analyse des composés phénoliques

7.1 Solutions étalon et substrats

7.1.1 Les composés en solution stock

Composé	Solution stock	Solution étalon	Fournisseur /référence
Acide chlorogénique (5-CGA)	100 mM dans EtOH75%	25µM dans méthanol 50%	C3878, SA
Acide 3,5-dicaféoyl-quinique (3,5-DCQ)	20 mM dans méthanol70% pH3	20µM dans méthanol 50%	Produit en interne par PAT
Acide quinique	100 mM dans l'eau ultra-pure	50µM dans méthanol 50%	1594506, SA
Acide caféique	100 mM dans EtOH75%	50µM dans méthanol 50%	C0625, SA
Acide *p*-coumarique	100 mM dans EtOH75%	50µM dans méthanol 50%	C9008, SA
Acide *t*-cinnamique	100 mM dans EtOH75%	50µM dans méthanol 50%	C80857, SA
Acide shikimique	100 mM dans l'eau ultra-pure	50µM dans méthanol 50%	S5375, SA
Acide férulique	100 mM dans EtOH50%	50µM dans méthanol 50%	128708, SA
Coumaroyl-quinate	100mM dans tampon NaPi pH7	50µM dans méthanol 50%	obtenus en HPLC préparative au laboratoire
Coumaroyl-shikimate	100mM dans tampon NaPi pH7		

Tableau 25 : Liste des composés utilisés comme étalons ou substrats pour les analyses biochimiques et les tests d'incubation enzymatique. SA : Sigma-Aldrich

Les composés utilisés dans le cadre des analyses phytochimiques et des réactions enzymatiques sont commandés chez Sigma-Aldrich. La préparation des molécules en solution stock est décrite dans le Tableau 25.

7.1.2 La synthèse des esters de CoA *via* la 4CL

Les esters de coenzyme A (*p*-coumaroyl-, caféoyl, cinnamoyl-, féruloyl- CoA) ont été synthétisés *via* la 4CL1 en s'inspirant du protocole décrit par Beuerle et Pichersky, 2002. Le protocole initial de synthèse a été modifié afin d'obtenir des concentrations d'esters de CoA suffisants pour être identifiés en UPLC-MS et les utiliser pour les tests d'incubation avec l'HCT.

Les réactifs et les concentrations utilisés dans la réaction ainsi que la durée d'incubation sont indiquées dans le Tableau 30. La réaction s'est déroulée à 30°C à l'obscurité et a été arrêtée par addition de 10µL d'HCl 4N.

Le suivi de la synthèse enzymatique est effectué au spectrophotomètre UV en utilisant une cuve en quartz. Les produits concentrés sont dilués au 1/100ème dans le tampon de la réaction et la densité optique de chaque produit est mesurée à 346, 310, 333 et 333nm correspondant aux longueurs d'ondes d'absorption maximale du caféoyl-CoA, du cinnamoyl-CoA, *p*-coumaroyl-CoA et féruloyl-CoA dans l'ordre respectif. Les concentrations sont calculées avec la loi de Beer-Lambert de formule suivante :

$$\mathbf{A = \varepsilon \times l \times C}$$

A = Absorbance ou densité optique (DO)
ε : coëfficient d'extinction molaire ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)
C: Concentration molaire en $mol.L^{-1}$

Ces composés étant instables même conservés à -20°C, sont immédiatement utilisés comme substrats pour les tests d'incubation avec l'HCT.

Pour l'identification en HPLC, les composés sont purifiés par une extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle (cf. δ 7.4.1).

7.2 Tests d'incubation de l'HCT recombinante avec les substrats

7.2.1 Réaction de synthèse des esters d'acide hydroxycinnamique

La réaction enzymatique a été effectuée dans un volume total de 400µL avec les réactifs suivants : 0,6mM d'ester de CoA synthétisé, 0,6mM d'acide quinique, 15mg/mL de HCT recombinante complété avec du tampon NaPi 0,1M pH7. Le mélange réactionnel est incubé pendant 1h à 30°C à l'obscurité. La réaction est arrêtée par ajout de 10µl d'acétonitrile : HCl 2N. Une centrifugation de 10 minutes à 10000xg à température ambiante permet d'éliminer les débris de protéines. Les produits sont ensuite purifiés par extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle (cf δ 7.4.1).

7.2.2 Réaction de synthèse du 3,5-DCQ par l'HCT recombinante

Le test d'incubation de l'HCT d'ipomée en présence d'acide chlorogénique est préparé de la façon suivante pour un volume final de 200µL : 0,1mM de CoA, 0,1mM de CGA, 15mg/mL de HCT recombinante complétés avec du tampon NaPi 0,1M pH6. La réaction est incubée 15h à l'obscurité à température ambiante. 5µL d'acétonitrile : HCl 2N sont ajoutés à la fin de la réaction. La protéine est précipitée par une centrifugation de 10 minutes à 10000xg. Le produit est ensuite analysé en HPLC et identifié en MS.

7.3 Test d'incubation des extraits foliaires de tabacs transgéniques avec l'acide chlorogénique

100mg de jeunes feuilles fraîches sont broyées dans 500µL de tampon NaPi0,1M pH6. Les extraits sont ensuite centrifugés pendant 10minutes à 10000xg à 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré et les protéines totales sont dosées au Qubit. La réaction est ensuite réalisée avec 20mg/mL final de protéines totales dans les conditions décrites au δ 7.2.2.

7.4 Extraction des acides phénoliques

7.4.1 Extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle

Les produits de la réaction enzymatique sont extraits 2 fois à l'acétate d'éthyle (v/v). Une centrifugation de 10 minutes à 12400 xg à température ambiante est effectuée après chaque extraction. Le volume est fractionné en deux phases. La phase supérieure (organique) contenant les esters de CoA est récupérée. Le solvant est évaporé dans un « speedvac » afin de concentrer les produits. Enfin, le culot est resolubilisé dans 50µL de méthanol 50%. Le contenu en métabolites est analysé en HPLC.

7.4.2 Extraction hydro-éthanolique des tissus végétaux

L'extraction hydro-éthanolique est une méthode classique d'extraction effectuée à partir de matière sèche. Les tissus sont broyés à l'azote liquide puis lyophilisés. La poudre est ensuite solubilisée dans de l'éthanol 70% froid à raison de 10mg/mL. Le mélange est mis sous agitation à 1000rpm à température ambiante pendant 30 minutes puis centrifugé à 10000 xg pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et filtré sur 0,2µm avant d'être transféré dans des vials HPLC.

7.5 Méthodes de détection des acides phénoliques

7.5.1 Détection à l'HPLC

Une méthode HPLC permettant d'identifier le 3,5-DCQ a été mise au point au laboratoire. Cette méthode est utilisée pour doser l'acide chlorogénique et le 3,5-DCQ et a été appliquée pour la détection des autres esters d'acide hydroxycinnamique.

Le système HPLC (Shimadzu Prominence XR) utilisé est muni d'un détecteur PDA à balayage photodiode permettant de détecter les composés entre 220 et 370nm.

Les composés sont séparés sur une colonne C18 en phase inverse LiChroCart 250-4 (Licrospher® 100 RP-18, 5µm, Merck Millipore). La phase mobile est composée d'eau ultra-pure : acide ortho-phosphorique pH2,6 pour le solvant A et de méthanol pur pour le solvant B. La concentration de B initiale est de 23% et monte en gradient sur une durée totale de 60 minutes (43min : 55% ; 50min : 70% ; 55min : 70% ; 60min : 23%). 20µL d'échantillon et 10µL d'étalon sont injectés avec un débit de 0,7mL/min. Les teneurs en 3,5-DCQ et acide chlorogénique dans l'échantillon x sont déterminées à partir du rapport aire/concentration avec l'étalon selon la formule suivante :

$$Cx = \frac{Aire_x \text{ x } C_{étalon}}{Aire_{étalon}}$$

7.5.2 Identification en UPLC-MS

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse physico-chimique permettant de détecter et d'identifier les composés par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Le système UPLC (Shimadzu X-Terra) est muni d'une pompe délivrant un solvant binaire et d'un détecteur PDA. L'appareil est couplé à un spectromètre de masse en simple quadripole équipé d'une source d'ionisation par électro-nébulisation (ESI) en mode positif et négatif. Les paramètres de la méthode sont optimisés pendant la calibration de l'appareil (température d'interface : 300°C ; T°capillaire : 250°C ; température de la colonne : 40°C). La phase stationnaire est une colonne XB-C18 Phenomenex Kinetex, (L100mm x l2,1mm, taille des billes 2,6µm). Les composés sont séparés sous l'influence de la phase mobile (A : H_2O-AF 0,1% ; B : acétonitrile) paramétrée avec un gradient de B (0 min : 5% ; 13,5min : 40% ; 14min : 40% ; 15min : 5% ; 17min : 5%). Les échantillons sont injectés avec un volume de 5µL et analysés avec un débit de 0,5mL/min. La détection MS des composés se fait à l'aide d'un balayage de 100-1000m/z. Les données sont traitées avec le logiciel LabSolution version 5.60 SP2.

8 Test d'infection sur disques foliaires de tabac

8.1 Test anti-fongique sur les molécules pures

8.1.1 Les molécules testées et les témoins

		Solution stock
Molécules	5-CGA	10mg/mL dans l'eau distillée stérile
	3,5-DCQ	10mg/mL dans éthanol 5%
Témoins	T +: chitosan	5mg/mL dans acide acétique 0,5%+ Tween 20 0,5%
	T1 –	eau pH3
	T2 –	Ethanol 5%
	T3 –	acide acétique 0,5%+ Tween 20 0,5%

Tableau 26 : Composition des molécules tests et des témoins utilisés dans les tests anti-fongiques.

La solution mère de chitosan est préparée à 5g/L dans 0,5% d'acide acétique et 0,5% de Tween20. Les solutions stock d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ sont préparées comme indiqué dans le Tableau 26. Les solutions sont ensuite filtrées sur 0,2µm avant d'être incorporées dans les milieux de culture.

8.1.2 Test d'inhibition des molécules sur la croissance fongique

Le test d'inhibition du champignon est réalisé sur les milieux de culture propres à chaque champignon (cf. δ 3.3) en y incorporant les molécules testées (5-CGA et 3,5-DCQ) à 0 / 17,5/ 35 / 75 / 125 / 250 et 500mg/L.

Des disques d'agar de 6mm de diamètre sont prélevés sur une culture âgée de 10 jours pour *Botrytis cinerea* et 15 jours pour *Phytophthora parasitica* et sont placés au centre de la gélose. Les boîtes sont scellées et incubées à l'obscurité à 25°C pour *Phytophthora parasitica* et 20°C pour *Botrytis cinerea*.

Le diamètre de l'hyphe est mesuré tous les jours jusqu'à ce que l'hyphe atteigne les bords de la boîte. Le pourcentage d'inhibition de la croissance est calculé avec la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(C-T)}{(C-n)} \times 100$$

C, T: moyennes des 3 réplicats
C: contrôle
T: Traitement
n: diamètre du disque d'agar inoculé

Des boîtes témoins (Tableau 26) sont inoculées dans les mêmes conditions que les molécules tests. Le chitosan, connu pour inhiber ces champignons (Junguang Xu, 2007; Reglinski *et al*., 2010) est utilisé comme témoin positif.

8.2 Test d'infection fongique sur feuille détachée

8.2.1 Préparation de la suspension de spores de *Botrytis cinerea*

Pour obtenir les spores de *Botrytis cinerea*, un fragment d'agar prélevé d'une culture a été déposé sur des feuilles de *vitro* plants de tabac. Les feuilles ont été placées dans des boîtes de Pétri sur un papier filtre stérile imbibé d'eau stérile. Les boîtes sont incubées à 25°C au phytotron pendant 10 jours. La suspension de spores est préparée selon les indications de la publication de Carstens *et al*., 2003. Les spores sont récoltées en inondant la surface avec 1mL de milieu PDB stérile. La suspension de spores est filtrée sur 100µm (filtres Miracloth) et la concentration est ajustée à 2,5 x 10^6 spores par mL à l'aide d'un haemocytomètre.

8.2.2 Inoculation des feuilles détachées

Les feuilles prélevées sur des plantes âgées de 2 mois sont placées dans des boîtes de Pétri contenant un papier filtre imbibé d'eau. Cinq répétitions sont réalisées sur 3 plantes transgéniques (événements de transformation indépendants). Deux points d'inoculation de 2µl de suspension de spores à 2,6.10^6 spores/mL sont réalisés sur la surface adaxiale (face brillante) de la feuille. La viabilité des spores est vérifiée en parallèle avec un haemocytomètre. Les boîtes sont scellées pour avoir 100% d'humidité et sont placées à 25°C. Les symptômes sont observés tous les jours.

RESULTATS & DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Chapitre 1 : Identification des gènes impliqués dans la biosynthèse des dérivés d'acide caféoyl-quinique

1.1 Etude phylogénétique

Un premier travail a été initié par Dr Barbara Menin, en post-doctorat au LAE, afin de déterminer la nature de l'enzyme impliquée dans la réaction d'estérification de l'acide chlorogénique. Des conditions optimales ont été mises en place par PAT afin d'augmenter la production de 3,5-DCQ à partir de racines d'ipomées en les cultivant en condition d'azote limitant. La présence en forte concentration de 3,5-DCQ dans les racines d'ipomée sous-entend la présence en grande quantité d'enzymes potentiellement impliquées dans la synthèse de 3,5-DCQ, et des ARN messagers codant ces enzymes dans ces tissus. Pour identifier ces enzymes, l'approche utilisée a consisté à générer une base de données bioinformatique (banque de RNAseq) contenant les séquences correspondant à l'ensemble des ARN messagers présents dans les racines d'ipomées soumises à un stress azoté pour stimuler la production de 3,5-DCQ. Pour cela, les ARN totaux ont été extraits de ces tissus et séquencés par pyro-séquençage lors de l'année 2012 (Technologie 454 GS FLX de Eurofins MWG). L'exploration de cette base de données a permis de sélectionner 13 séquences candidates présentant des homologies de séquence avec les HCT et HQT décrites par ailleurs dans la littérature (Hoffmann *et al*., 2004, 2005; Niggeweg *et al*., 2004; Comino *et al*., 2007, 2009; Lepelley *et al*., 2007). Les séquences sont répertoriées dans la demande de brevet n°WO2013/17805 A1 déposée en 2013 (Annexe 1).

A l'issue de ces travaux, les 13 séquences nucléiques candidates ont été traduites *in silico* avec le logiciel Expasy. Les séquences peptidiques ont été alignées avec d'autres séquences d'acyltransférases BAHD caractérisées du point de vue moléculaire ou fonctionnel (Annexe 12). Une analyse phylogénétique a été réalisée sur les 13 protéines déduites des séquences codantes identifiées. Ces séquences ont été comparées avec des enzymes de la superfamille des acyltransférases BAHD. Au moins deux séquences protéiques ont été choisies comme membres représentatifs des clades I, II, III, IV et V d'après la classification donnée par D'Auria, 2006. Récemment, une nouvelle classification a été proposée et indique que le clade V est subdivisé en deux groupes : le sous-clade Va regroupe les acyltransférases impliquées dans la formation d'esters volatils principalement ; le sous-clade Vb est représenté par les HCT et HQT impliquées dans la synthèse de l'acide chlorogénique et des monolignols (Tuominen *et al*., 2011).

L'arbre phylogénétique le plus parcimonieux a été construit avec la méthode algorythmique Neighbour-Joining et le logiciel MEGA 6. Parmi les acyltransférases connues, la protéine *Eco*ATA issue d'*Escherichia coli* est considérée comme l'une des plus ancestrales. Elle a donc été choisie comme groupe extérieur pour enraciner l'arbre (Wang *et al*., 2015). Les différents

clades de l'arbre phylogénétique sont basés sur la classification de D'Auria, 2006 et Tuominen *et al*., 2011.

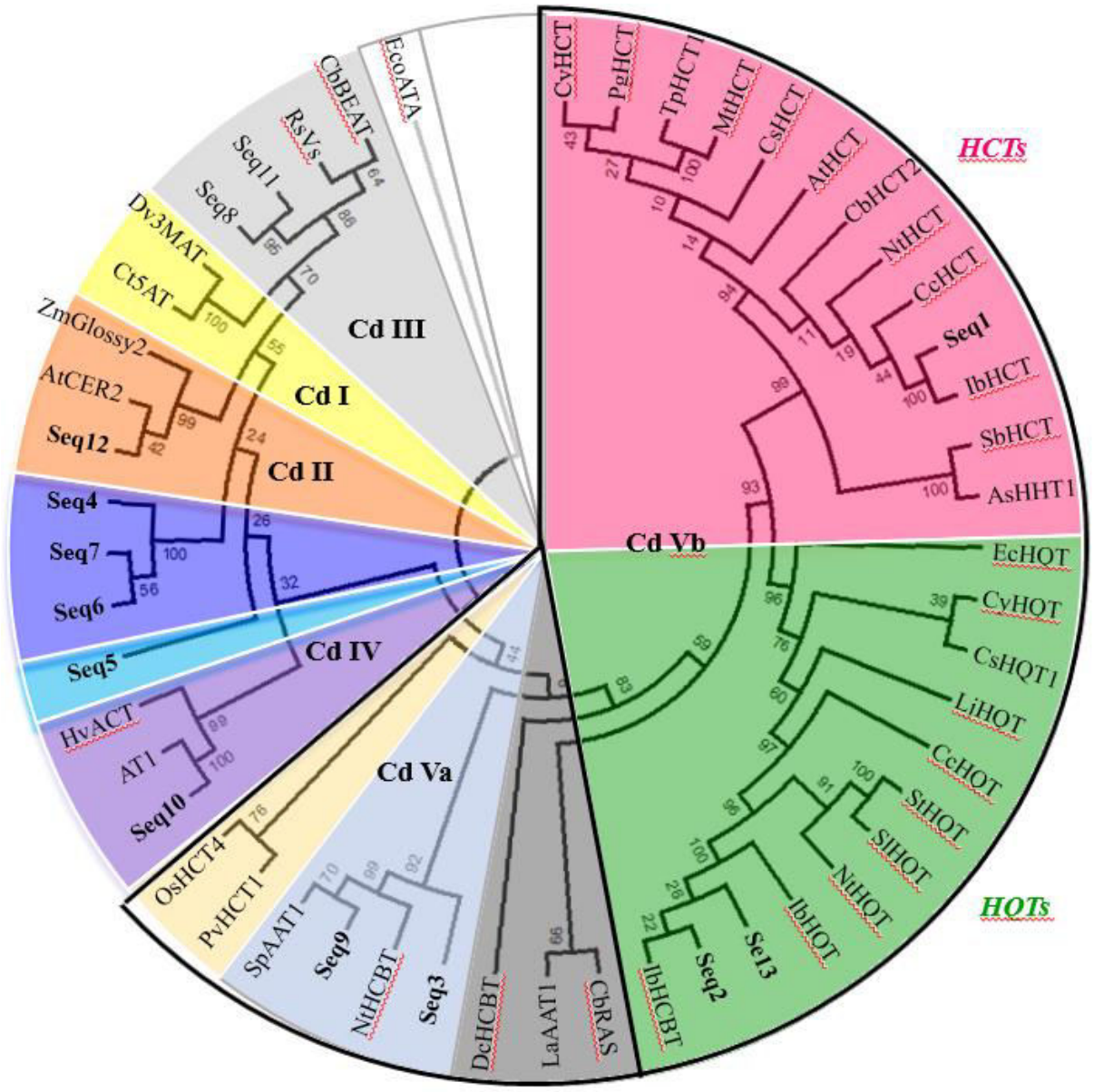


Figure 30 : Arbre phylogénétique des séquences candidates avec des membres représentatifs des acyltransférases de la famille des BAHD caractérisées sur le plan moléculaire ou biochimique (d'après D'Auria, 2006; Tuominen et al., 2011). Le clade des HCT est marqué en rouge et le clade des HQT en vert. Les séquences candidates sont marquées en caractère gras. Construction avec la méthode Neighbour-Joining. Groupe extérieur : EcATA (acyltransférase d'E.coli). La distance des branches représente le lien de proximité entre les protéines et les valeurs de Bootstrap (1000 répétitions) sont indiquées au niveau des nœuds qui génèrent les clades (Cd). Les abréviations des espèces sont les suivantes : As : Avena sativa ; At : Arabidopsis thaliana ; Cb : Coleus blumei ; Cc : Coffea canephora ; Cs : Cucumis sativus ; Cy : Cynara cardunculus ; Dc : Dianthus caryophillus ; Dv : Dahlia variabilis ; Ec : Eryhtroxylum coca ; Eco : Escherichia coli ; Gt : Gentiana trifolia ; Hv : Hordeum vulgare ; Ib : Ipomoea batatas ; La : Lavandula augustifolia; Lj : Lonicera japonica ; Mt : Medicago truncatula ; Nt : Nicotiana tabacum ; Os : Oryza sativa ; Pg : Platycodon grandifolium ; Pv : Panicum vergatum ; Rs : Rauvolfia serpentina ; Sb : Sorghum bicolor; Sp : Solanum penellii ;

Sl : Solanum lycopersicum ; St : Solanum tuberosum ; Tp : Trifolium pratense ; Zm : Zea mays. Les numéros d'accession sont listés comme suit : AsHHT1 : BAC78633 ; AT1 : AET80688 ; AtCER2 : AAM64817 ; AtHCT : NP_199704.1 ; CbBEAT : AAN48360 ; CbHCT2 : CBI83579 ; CbRAS : A0PDV5 ; CcHCT : ABO47805 ; CcHQT : ABO77957 ; CyHQT : ABK79689 ; CsHCT : NP_001295843.1 ; CsHQT : ACF3707957 ; DcHCBT2 : O23917 ; Dv3MAT : AAO12206 ; EcHQT : AFF19203 ; EcoATA : NP_312354.1 ; Gt5AT : BAA74428 ; HvACT : AAO73071 ; IbHCT : BAJ14794 ; IbHCBT : BAA87043 ; IbHQT : BAJ14795 ; LaAAT1 : ABI48360 ; LjHQT : ACZ52698 ; MtHCT : XP_013454529 ; NtHCBT : AAN09798 ; NtHCT : CAD47830 ; OsHCT4 : NP_001057003 ; PgHCT : AEM63675 ; PvHCT1 : AFY17066 ; RsVs : CAD89104 ; SbHCT : EES05411 ; NtHQT : CAE46932 ; SlHQT : NP_001234850 ; SpAAT1 : NP_001310384 ; StHQT : ABA46756 ; TpHCT1 : ACI16630.

L'arbre phylogénétique révèle une classification très dispersée des séquences candidates (Figure 30). Ces séquences sont divisées en deux catégories : clusters (plusieurs séquences dans un même groupe) ou clade unique (une seule séquence). Certaines sont regroupées dans le même clade que des acyltransférases de la famille des BAHD de fonction connue. Le clade I qui regroupe des enzymes impliquées dans la synthèse des anthocyanines (Fujiwara *et al*., 1997; Suzuki *et al*., 2002). Parmi les 13 séquences candidates, aucune n'est comprise dans ce clade.

N° accession	Protéine	Identité d'acides aminés avec la séquence 1
BAJ14794	HCT d'*Ipomoea batatas* (IbHCT)	99%
AB047805	HCT de *Coffea canephora* (CcHCT)	85%
CAD47830	HCT de *Nicotiana tabacum* (NtHCT)	84%
AAZ80046	HCT de *Cynara cardunculus* (CyHCT)	82%
AEM636675	HCT de *Platycodon grandifolium* (PgHCT)	80%
NP_199704	HCT d'*Arabidopsis thaliana* (AtHCT)	77%
AC1228534	HCT1 de *Trifolia pratense* (TpHCT)	76%
XP_013454529	HCT de *Medicago truncatula* (MtHCT)	76%

Tableau 27 : Comparaison par alignement BLAST de la séquence n°1 déterminée in silico chez Ipomoea batatas, avec d'autres séquences d'HCT répertoriées dans la Genbank.

La première séquence (seq1) prédite de la banque de RNAseq de PAT est classée dans le sous-groupe Vb regroupant les hydroxycinnamoyl shikimate/quinate acyltransférases (HCT et HQT). Un certain nombre de transférases à activité HCT catalysant la synthèse d'acides caféoyl-quiniques ont été décrites dans la littérature (Hoffmann *et al*., 2004; Niggeweg *et al*., 2004; Comino *et al*., 2007, 2009). En réalisant une comparaison de séquences avec l'outil BLAST, on constate une très forte ressemblance entre ces séquences. Elle partage également 98% d'identité d'acides aminés avec une transférase d'ipomée déjà répertoriée dans la banque

de données Genbank (ID : BAJ14794) qui n'a pas été caractérisée sur le plan fonctionnel. Dans la suite de ce travail, la séquence 1 sera nommée « IbHCT ». Cette séquence possède 85% d'identité d'acides aminés avec l'HCT de *Coffea canephora* (ID : AB047805), suivie de 84% avec celle du tabac (ID : CAD47830) et de 82% avec celle de *Cynara cardunculus* (ID : AAZ80046). Le pourcentage d'identité est relativement élevé entre ces trois protéines. Les HCT caractérisées chez d'autres espèces n'ont en commun qu'une identité en termes d'acides aminés inférieure à 80% (Tableau 27).

Le clade Vb est subdivisé en 2 sous-groupes, celui des HCT et celui des HQT. Ces dernières ont été caractérisées biochimiquement chez de nombreuses espèces comme la tomate et l'artichaut (Hoffmann *et al*., 2003; Comino *et al*., 2009). Dans ce cluster, on retrouve les séquences 2 et 13 qui sont quasiment identiques (99%) et sont donc potentiellement des variants l'une de l'autre. Ces séquences possèdent un haut pourcentage d'identité (99%) avec une HQT et une HCBT d'ipomée déposées chez Genbank (ID ; HQT : BAJ14795 ; HCBT : BAA87043) dont les activités n'ont pas été élucidées. Cette conservation en acides aminés est cependant plus faible que dans le cas de la séquence peptidique des HCT de café et d'artichaut. Cette différence en termes de composition en acides aminés plaide fortement en faveur d'une fonction différente que celle des enzymes déjà décrites dans la littérature. Nous appellerons dans ce travail la séquence 2 sous le nom « IbHQT » et la séquence 13 : « IbHCBT ». Ces séquences partagent environ 80% d'identité avec les HQT de tomate, de tabac et de café et 71% avec celle d'artichaut (Tableau 28).

N° accession	Protéine	Identité d'acides aminés avec Seq 2
BAJ14795	HQT d'*Ipomoea batatas* (IbHQT)	99%
NP_001234850	HQT de *Solanum lycopersicum* (SlHQT)	81%
AJ582652	HQT de *Lycopersicum esculentum* (LeHQT)	83%
CAE46932	HQT de *Nicotiana tabacum* (NtHQT)	83%
ABO77957	HQT de *Coffea canephora* (CcHQT)	79%
ACF37072	HQT de *Cynara cardunculus* (CyHQT)	71%

Tableau 28 : Comparaison par alignement BLAST de la séquence n°2 identifiée in silico chez Ipomoea batatas avec d'autres séquences d'HQT de la banque Genbank.

A côté du clade Vb, les séquences 3 et 9 sont comprises dans le clade Va qui inclut l'HCBT de tabac (ID : AAN09798), bien qu'elles ne partagent que respectivement 37% et 41% d'identité avec celle-ci. La séquence 3 présente 33% d'identité avec l'HCT de café et 31% avec celle de tabac. Elle possède 29,9% d'identité avec l'HQT de *Coffea canephora* et 32% avec celle de *Cynara cardunculus*. Cette séquence est néanmoins semblable à une autre HQT de café (ID :

CAT00082) avec laquelle elle partage 77% d'identité au niveau peptidique. La séquence 9, quant à elle, montre une homologie plus forte (48%) avec une méthanol O-anthraniloyl transferase-like (SpAAT1) de l'espèce *Solanum pennellii* (NP_001310384) impliquée dans la synthèse des esters volatils (Goulet *et al*., 2015).

Les autres séquences candidates sont assez éloignées des HCT et HQT de café et d'artichaut puisqu'elles présentent moins de 30% d'identité avec celles-ci. Ces séquences sont rassemblées dans des clades d'enzymes BAHD ayant une toute autre fonction que les HCT et HQT. Parmi elles, la séquence 10 appartient au clade IV représenté par l'acyltransférase HvACT impliquée dans la synthèse d'agmatine (Burhenne *et al*., 2003b), mais elle n'a que 50% d'identité avec celle-ci. Elle est plus proche (66% d'identité) de la protéine AT1 de *Nicotiana attenuata* (ID : AET80688) qui catalyse la formation de putrescine. Chez l'ipomée, la voie de biosynthèse de la putrescine connue actuellement fait intervenir une autre enzyme de la famille des peroxidases (Castillo *et al*., 2003), mais aucune acyltransférase n'a été identifiée dans cette fonction.

Si l'on regarde les autres clades représentatifs des BAHD, on retrouve dans le clade II la séquence 12 voisine (à 40% d'identité) de la protéine AtCER2 (ID : AAM64817), impliquée dans la synthèse des cires épicuticulaires (Xia *et al*., 1996). Bien que distante des HCT et des HQT initialement identifiées (moins de 30% d'identité), cette séquence est plus proche d'une HCT potentielle de *Gossypium arboreum* (ID : KHG00208.1) avec 52% d'identité.

Les séquences 8 et 11 sont regroupées dans le clade III avec la vinorine synthase (ID : CAD89104) et CbBEAT (ID : AAN48360) (D'Auria *et al*., 2002b; Bayer *et al*., 2004), bien qu'elles n'ont en commun que 30% d'identité. L'alignement réalisé par BLAST sur Genbank montre que ces gènes partagent tout de même une homologie plus importante avec une 3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyl transférase de *Theobroma cacao* (ID : XP_007037900.1) potentielle, avec une identité de 40% pour la séquence 11 et de 38% pour la séquence 8.

Certaines séquences présentent une homologie plus importante avec des transférases potentielles mais aucune fonction n'a été attribuée aux enzymes qui se trouvent dans ce clade. C'est le cas des séquences 4, 5, 6 et 7. Bien que plus distantes des HCT et HQT d'artichaut et de café (environ 26% d'identité), les analyses réalisées par BLAST sur Genbank montrent que les séquences 4, 6 et 7 ont 93% d'identité entre elles, et ressemblent fortement (68% d'identité) à une shikimate-O-hydroxycinnamoyl tranferase-like isolée à partir de *Nicotiana tabacum* (XP_009781170) encore non caractérisée fonctionnellement. La séquence 5 est plus proche (78% d'identité) d'une acétyltransférase At3g50280 isolée de *Nicotiana sylvestris* de fonction inconnue à ce jour. Elle possède aussi 66% d'identité avec une acyltransférase BAHD DCR-like de *Vitis vinifera* (XP_002278801) de fonction non identifiée.

D'après l'analyse phylogénétique basée sur les séquences protéiques, les protéines IbHQT et IbHCT sont les enzymes les plus proches des HCT de café, de tomate et d'artichaut impliquées dans la synthèse des esters d'acide caféoyl-quinique. Nous avons donc choisi de nous focaliser sur ces enzymes dans un premier temps.

1.2 Comparaison par alignement avec des séquences d'acyltransférases de la famille des BAHD et recherche des séquences consensus

Afin d'identifier les séquences consensus, les séquences candidates ont été alignées avec des membres représentatifs de la structure des acyltransférases BAHD (Figure 31 et Figure 32). L'alignement a été réalisé avec l'outil clustalW2 et les séquences consensus ont été mises en évidence à l'aide du logiciel BioEdit. Dans toutes les séquences alignées, on constate la présence des motifs **HXXXD** et **DFGWG** (Figure 31 et Figure 32) caractéristiques des acyltransférases de la famille des BAHD (D'Auria *et al*., 2002b) identifiés comme des sites actifs notamment pour le transfert du groupement acétyl (Suzuki *et al*., 2003; Unno *et al*., 2007). Comme le souligne la publication de Lallemand *et al* (2012), certains résidus semblent être impliqués dans l'interaction substrat-enzyme propre aux HCT et HQT. Chez l'ipomée, nous notons qu'il y a une conservation de séquence relativement forte entre l'HCT et l'HQT. Les résidus K237, D282, R286, R371 et le motif « YSSY » en position 252-256 identifiés dans la séquence d'IbHCT sont présumés être les sites de liaison au coenzyme A (Figure 31). Pour l'HQT, les résidus sont quasiment identiques à l'exception d'une tyrosine à la place d'une sérine en position 253. Un grand nombre de résidus ont été identifiés comme étant potentiellement à l'origine de l'interaction avec le noyau hydroxycinnamoyl chez IbHCT (T36, P37, S38, M151, H153, H154, G158, G161, L162, H163, W369, L372, M387). Certains de ces résidus sont différents pour l'HQT (L45, L46, V151, T154, S161). D'autres sont supposés être les sites de réception du groupement acyl dans IbHCT (P32, F34, T36, I279, A280, T302, R354, F359, GITS en position 365-368, W369, Y394, L397, F399) qui varient cependant chez IbHQT (G32, I34, L45, V279, N365, N367, T397, Y399).

Un autre motif très conservé au sein des HCT et des HQT est le motif **SNLDL** situé à l'extrémité N-terminale de la protéine (Figure 31). Cette région semble être spécifique au clade Vb d'après Tuominen *et al*., 2011. Ces auteurs ont réalisé une étude prédictive de localisation subcellulaire en émettant l'hypothèse que ce motif pourrait être un peptide signal. Ces recherches restent encore à approfondir par des approches de mutagénèse et de caractérisation structurale.

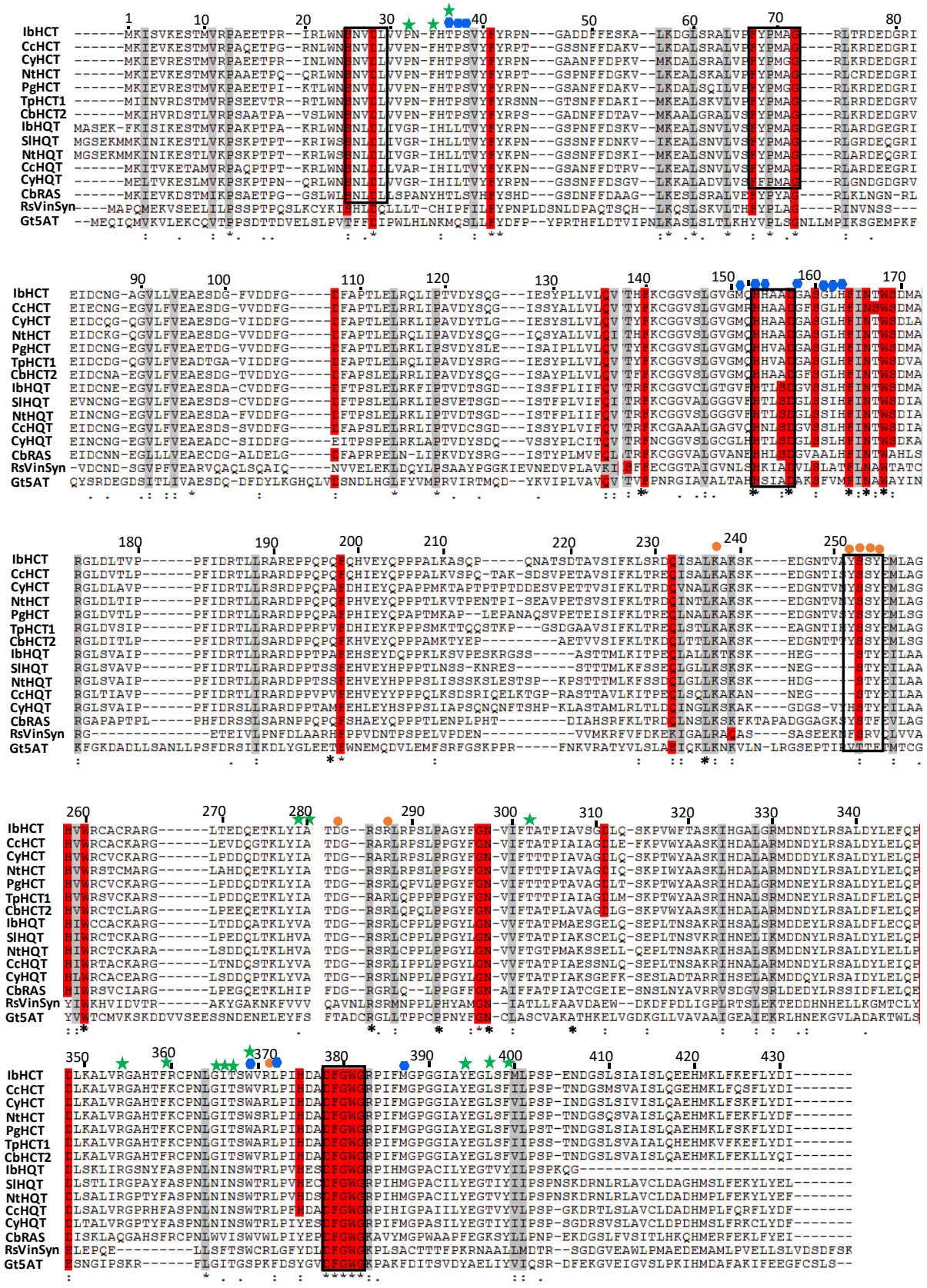


Figure 31 : Alignement des séquences codant des HCT et HQT avec des membres représentatifs de la famille des acyltransférases BAHD. Les résidus conservés à 95% sont surlignés en rouge et en gris pour les résidus conservés à 90%. Les motifs conservés sont encadrés en noir. Les résidus prédits dans l'interaction avec les substrats sont marqués par des étoiles vertes pour

les noyaux accepteurs d'acyl, par des ronds bleus pour les noyaux hydroxycinnamiques et par des ronds orange pour le CoA. Les abréviations des espèces sont les suivantes : Cb : Coleus blumei ; Cc : Coffea canephora ; Cy : Cynara cardunculus ; Gt : Gentiana trifolia ; Ib : Ipomoea batatas ; Nt : Nicotiana tabacum ; Pg : Platycodon grandifolium ; Sl : Solanum lycopersicum ; Tp : Trifolium pratense. Les numéros d'accession sont listés comme suit : Gt5AT (Clade I) : BAA74428 ; CbRAS (Clade Va) : A0PDV5 ; CbHCT2 (Clade Vb) : CBI83579 ; CcHCT (Clade Vb) : ABO47805 ; CcHQT (Clade Vb) : ABO77957 ; CyHQT (Clade Vb) : ABK79689 ; NtHQT (Clade Vb) : CAE46932 ; SlHQT (Clade Vb) : NP_001234850 ; TpHCT1 (Clade Vb) : ACI16630 ; IbHCT (Clade Vb) : séquence PAT ; IbHQT (Clade Vb) : séquence PAT ; NtHCT (Clade Vb) : CAD47830 ; PgHCT (Clade Vb) : AEM63675 ; RsVs (Clade III) : CAD89104.

Afin de montrer les différences et les ressemblances avec les acyltransférases BAHD, nous avons réalisé l'alignement des autres séquences candidates avec certaines séquences de BAHD déjà caractérisées. Comme le montre la Figure 32, on retrouve certains acides aminés communs à IbHCT notamment ceux potentiellement impliqués dans la liaison avec les substrats. C'est notamment le cas du résidu D358 dans les séquences 3, 4, 6, 7, 9, 10 et 12 équivalent à D282 dans IbHCT. Le deuxième résidu conservé dans toutes les séquences est le R362 équivalent au R286 chez IbHCT. Seule la séquence 9 ne possède pas ce site. Le troisième acide aminé identique est l'arginine en position 461 dans les séquences 3, 5, 9, 10 et 11 retrouvée en position 371 dans la séquence d'IbHCT. Le quatrième résidu conservé est la sérine en position 325 dans les séquences 5, 10 et 11 équivalente au S253 chez IbHCT. La présence de ces quatre résidus semble être importante pour la liaison au CoA.

D'autres résidus en commun avec IbHCT sont potentiellement impliqués dans la liaison au groupement hydroxycinnamique. Le premier est l'histidine dans le motif **HXXXD**. Le deuxième est le G190 présent dans les séquences 3, 5, 9, 10 et 11, le troisième est le W459 dans les séquences 3, 10 et 11 et le dernier est le L462 uniquement présent dans la séquence 3. Les sites spécifiques de liaison au groupement accepteur d'acyl identifiés chez IbHCT (Figure 31) ne sont pas retrouvés dans les autres séquences. Ces différences de résidus peuvent changer les interactions entre la protéine et le substrat et ainsi modifier les propriétés de l'enzyme.

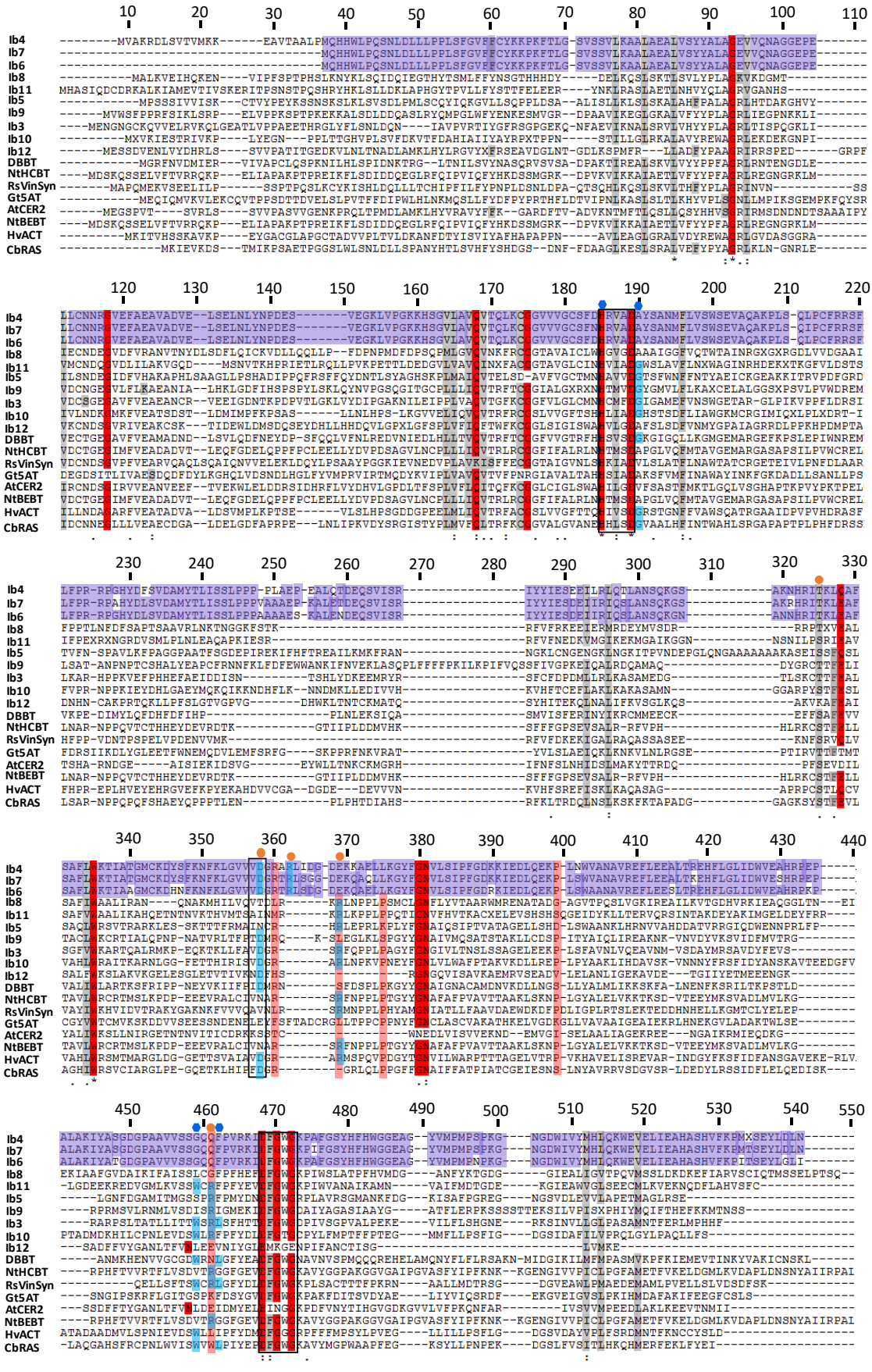


Figure 32 : Alignement des séquences protéiques candidates Ib3 à Ib12 avec des membres représentatifs de la famille des BAHD. Les résidus conservés à 95% sont surlignés en rouge et

les motifs conservés sont encadrés en noir. Les résidus prédits dans l'interaction avec les substrats sont marqués par des ronds bleus pour les noyaux hydroxycinnamiques et par des ronds orange pour le CoA. Les abréviations des espèces sont les suivantes : At : Arabidopsis thaliana ; Cb : Coleus blumei ; Gt : Gentiana trifolia ; Hv : Hordeum vulgare ; Ib : Ipomoea batatas ; Nt : Nicotiana tabacum ; Les numéros d'accession sont listés comme suit : AtCER2 : AAM64817 ; CbRAS : A0PDV5 ; Gt5AT : BAA74428 ; HvACT : AAO73071 ; NtHCBT : AAN09798 ; RsVs : CAD89104.

En conclusion de cette analyse *in silico*, l'analyse phylogénétique et l'alignement des séquences protéiques prédites *in silico* nous indiquent que les séquences n°1 (IbHCT) et n°2 (IbHQT) sont très proches des autres HCT impliquées dans la synthèse de l'acide chlorogénique et des DCQs. Nous pouvons alors supposer que ces deux protéines sont les enzymes responsables de la synthèse de 3,5-DCQ. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons regardé s'il existe une relation entre l'expression des gènes codant ces protéines et la synthèse d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ.

1.3 Etude comparative en condition d'azote limitant

Dans la suite de ce travail, nous avons analysé les teneurs en acide chlorogénique et 3,5-DCQ et regardé s'il y avait un lien avec l'expression des gènes. Les métabolites ont été analysés dans des racines de plantes cultivées en milieu pauvre en azote. L'effet de l'azote a déjà été décrit comme un facteur stimulant de la voie des phénylpropanoïdes (Chishaki et Horiguchi, 1997). Il a été montré chez *Matricaria chamomilla*, que les feuilles accumulaient plus d'acides phénoliques comme l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique chez des plantes soumises à une carence azotée (Kovacik *et al*., 2007). PAT utilise des conditions optimisées (déplétion en azote du milieu de culture) pour obtenir les meilleurs taux de production de 3,5-DCQ. Pour réaliser nos analyses, nous avons cultivé les plantes dans les mêmes milieux utilisés par l'entreprise pour se placer dans les conditions optimales de production de 3,5-DCQ. En parallèle, des plantes « contrôles » ont été cultivées avec un milieu enrichi en azote. Ces essais ont été réalisés en serre, pendant trois périodes consécutives avec trois répétitions biologiques (trois plantes différentes) pour chaque condition. Les plantes ont été observées pendant toute la période de culture puis ont été analysées par des approches biochimiques et d'analyse d'expression des gènes.

1.3.1 Observation phénotypique des plantes

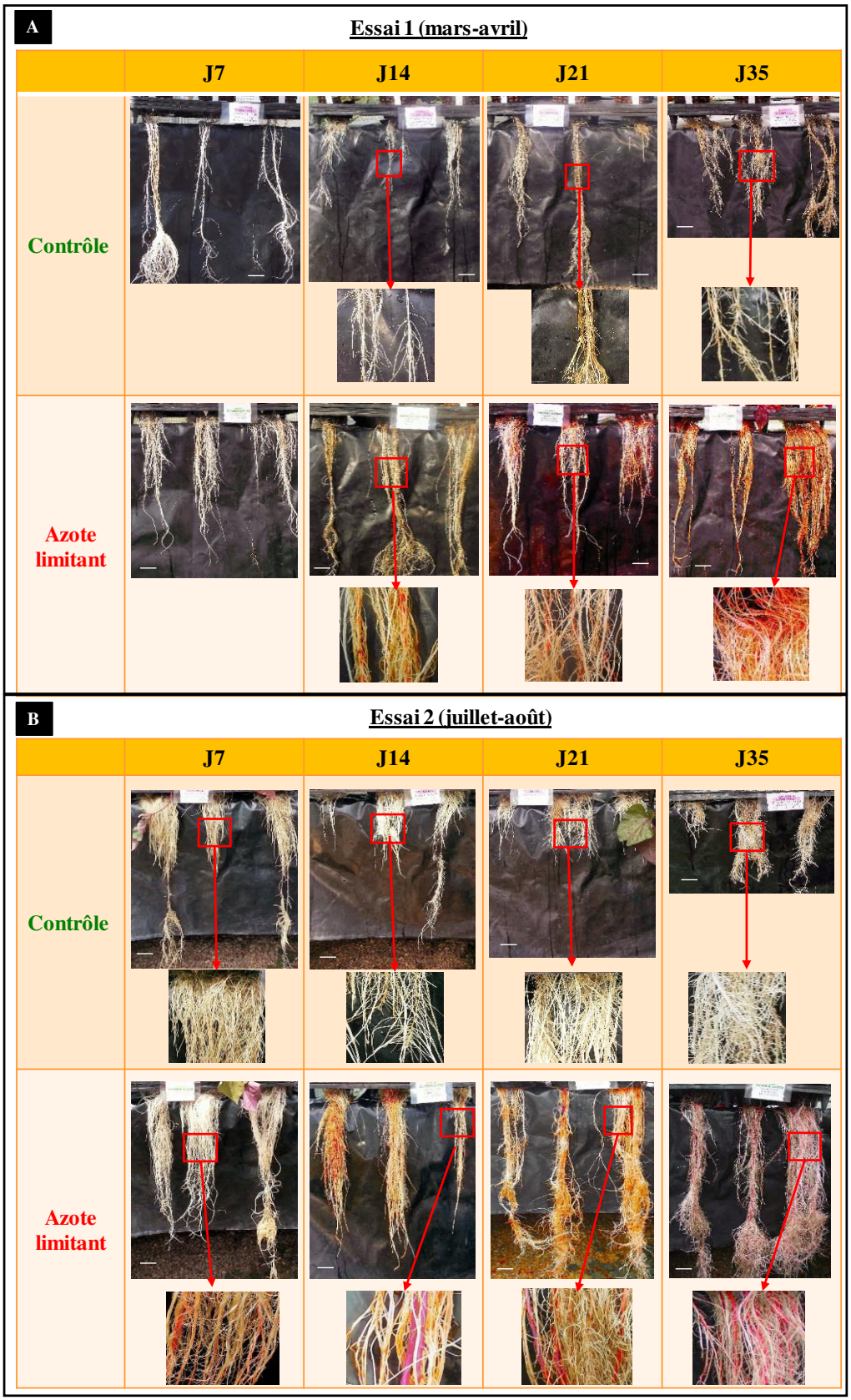


Figure 33 : Photographies des racines d'Ipomoea batatas cultivées en aéroponie en condition « contrôle » (apport d'azote dans le milieu) et en condition d'azote limitant (sans apport

d'azote dans le milieu). A : essai 1 (mars-avril) et B : essai 2 (juillet-Août). Barre d'échelle =5 cm.

Pendant les trois expérimentations, les plantes ont été cultivées en système aéroponique, avec un apport en microéléments contrôlé, ce qui nous a permis de nous affranchir des conditions aléatoires du sol. Un premier essai a été réalisé en mars-avril 2014. Deux autres essais consécutifs ont été répétés pendant l'été : juillet-Août pour l'essai 2 et septembre-octobre pour l'essai 3. Les plantes ont ainsi bénéficié des conditions optimales de croissance (lumière, température, aération).

Dès 7 jours de culture (Figure 33), les plantes cultivées en condition d'azote limitant présentent une biomasse racinaire plus importante que celle des plantes contrôle et la densité racinaire augmente chaque semaine. Par augmentation de la densité racinaire, on entend élongation racinaire, prolifération des racines latérales et production des racines (Zhang *et al*., 2007). A l'inverse, les parties aériennes se développent moins vite et forment moins de jeunes feuilles par rapport au contrôle (Figure 34). Ce phénomène, que l'on peut appeler « stress azoté », est bien connu pour son influence sur le développement de la plante (Robinson, 1994; Kovacik *et al*., 2007). Il a été clairement admis que la carence en azote inhibait la croissance des parties aériennes et stimulait la croissance des racines. Cette réponse compensatoire est due à une re-allocation de l'azote dans les racines par rapport aux feuilles (Scheible *et al*., 1997; Ågren et Franklin, 2003). La stimulation de production racinaire s'explique par le fait que la plante emploie cette stratégie pour explorer plus de surface et acquérir l'azote minéral disponible dans le sol (Hodge, 2004).

De plus, on observe chez les plantes stressées une coloration rose des racines qui s'accentue à mesure que la culture se prolonge, alors que les racines des plantes contrôle sont blanches (Figure 33). Ce changement de coloration s'observe également sur les parties aériennes, où l'on voit que les feuilles tendent vers une couleur rouge-foncée (Figure 34). Cette pigmentation est due à la présence des anthocyanes, dont la synthèse est stimulée en situation de carence azotée comme la plupart des métabolites secondaires (Hilbert *et al*., 2003; Soubeyrand *et al*., 2014).

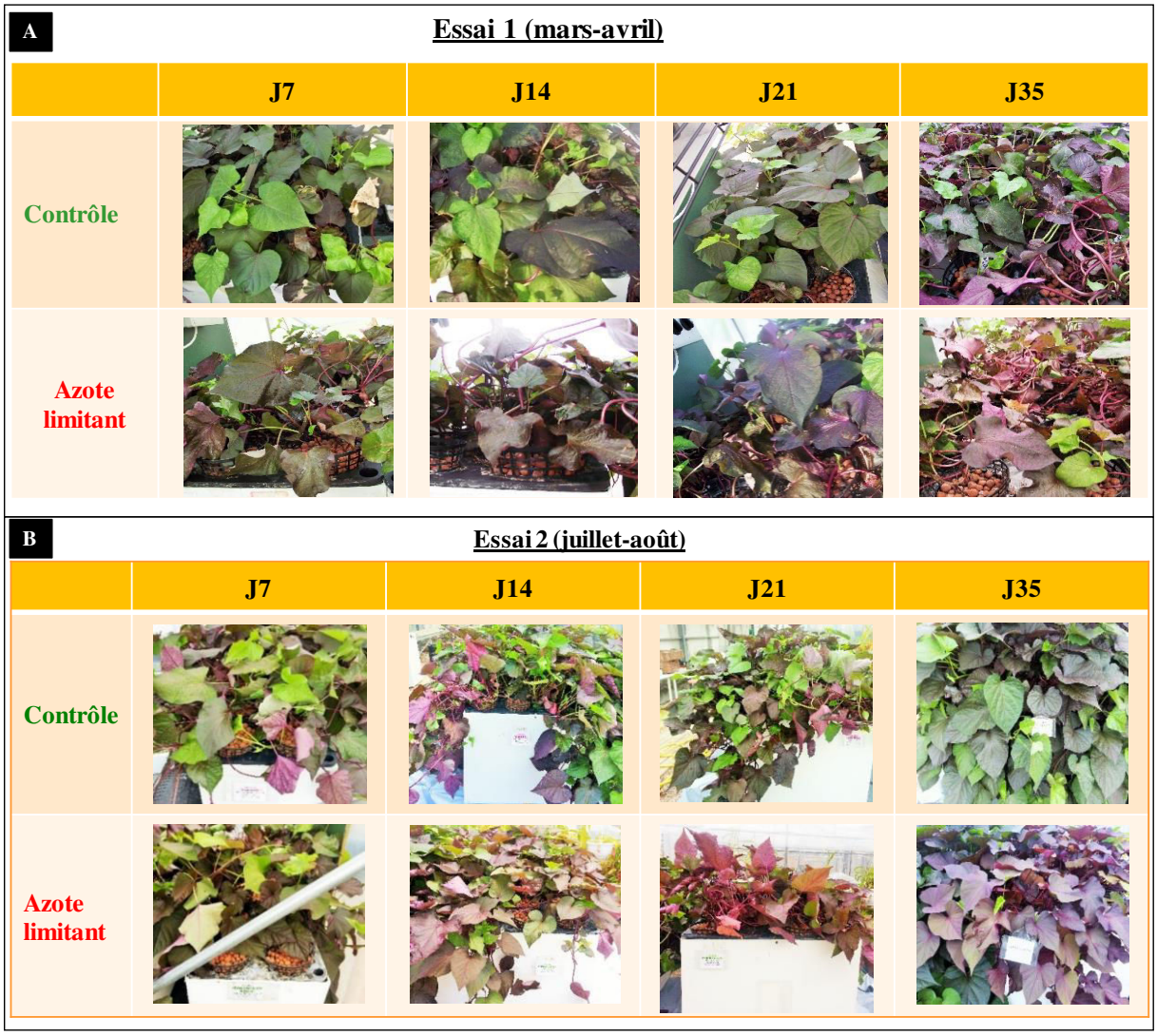
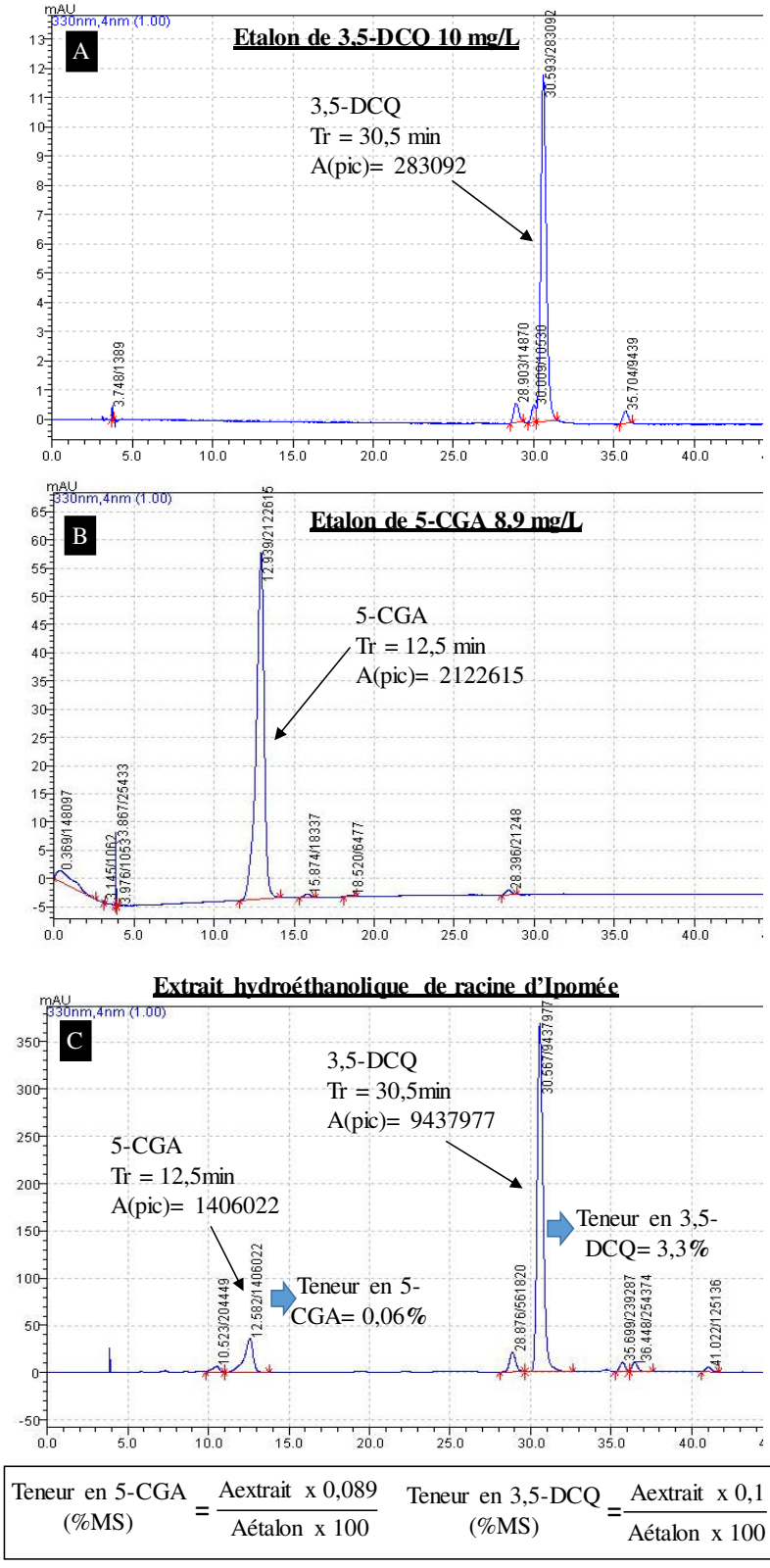


Figure 34 : Photographies des parties aériennes d'Ipomoea batatas cultivées en aéroponie en condition « contrôle » (apport d'azote dans le milieu) et en condition d'azote limitant (sans apport d'azote dans le milieu). A : essai 1 (mars-avril) ; B : essai 2 (juillet-Août).

1.3.2 Comparaison des teneurs en acide chlorogénique et en acide 3,5-dicaféoyl-quinique

Les racines précédemment observées ont été prélevées à différents temps et congelées dans de l'azote liquide avant d'être lyophilisées. Les acides phénoliques ont été extraits des racines comme cela a été décrit dans le paragraphe δ7.4.2, et analysées par chromatographie liquide (HPLC). Une analyse différentielle des profils obtenus a permis de mesurer les teneurs en acide chlorogénique et en 3,5-DCQ par comparaison avec des solutions étalon.

Les extraits racinaires ont été analysés par HPLC afin de déterminer les teneurs en acide chlorogénique et en 3,5-DCQ en rapportant la quantité de molécules à la quantité de matière sèche en pourcentage (g de molécules pour 100g de racine lyophilisée) (Figure 35).



$$\text{Teneur en 5-CGA (\%MS)} = \frac{\text{Aextrait} \times 0{,}089}{\text{Aétalon} \times 100} \qquad \text{Teneur en 3,5-DCQ (\%MS)} = \frac{\text{Aextrait} \times 0{,}1}{\text{Aétalon} \times 100}$$

Figure 35 : Chromatogramme à 330nm d'un extrait contenant de l'acide chlorogénique et du 3,5-DCQ. A : solution étalon d'acide chlorogénique (5-CGA, Sigma Aldrich Ref.C3878) à 8,9mg/L ; B : solution étalon de 3,5-DCQ (molécule produite par PAT) à 10mg/L. C : extrait hydro-éthanolique à partir de racines d'ipomée broyées et lyophilisées. Tr = Temps de rétention. A (pic) : aire du pic détecté.

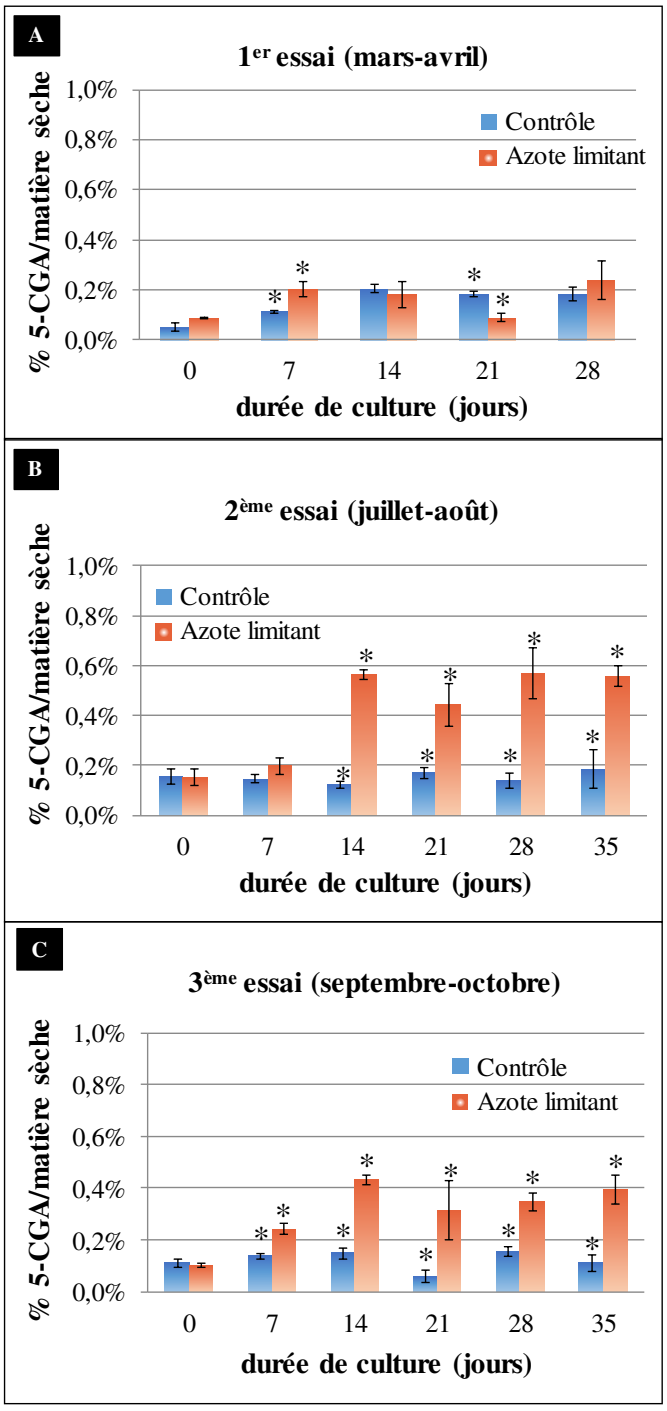


Figure 36 : Teneurs en acide chlorogénique dans des extraits hydro-éthanoliques de racines lyophilisées d'ipomée. Unité en ordonnée : % (g de 5-CGA pour 100g de matière sèche lyophilisée). Les barres d'erreur représentent les écart-types (n=3). Statistiques réalisées avec un test de Student (valeur p < 5%). A, B et C : répétitions expérimentales (essais).

Dans le cas du premier essai (Figure 36a), nous remarquons que les teneurs en acide chlorogénique sont beaucoup plus faibles que les autres essais. Pour la condition « azote limitant », la teneur augmente au 7ème jour, puis décline par rapport au contrôle. Rappelons que

les plantes ont été cultivées en mars-avril sous une serre chauffée avec une luminosité variable. A cette saison, les plantes n'étaient pas régulièrement exposées au soleil, or la lumière est un facteur important pour la croissance et la synthèse des phénylpropanoïdes dont l'acide chlorogénique (Grace *et al*., 1998; Giorgi *et al*., 2014). Cette fluctuation peut donc avoir un impact sur la synthèse d'acide chlorogénique ce qui peut expliquer ces variations de teneurs.

Dans le cas des deuxième et troisième essais (Figure 36b et c), nous observons que les plantes cultivées en condition d'azote limitant accumulent de forts niveaux d'acide chlorogénique, comme cela été démontré par des études précédentes (Fritz *et al*., 2006; Giorgi *et al*., 2009). Contrairement à l'essai 1, ces deux essais ont été conduits en été avec des plantes cultivées en conditions optimales.

En parallèle de l'analyse de CGA, nous avons également évalué l'impact des conditions de culture sur la production de 3,5-DCQ. Comme dans le cas du CGA, nous observons que pour la culture printanière, il y a une baisse de teneur en 3,5-DCQ par rapport aux cultures estivales (Figure 37). Ces problèmes de variabilités saisonnières pourraient être atténués par une culture en chambre phytotronique.

Bien qu'impacté par les conditions de culture, on constate toutefois que dans les trois cas, il y a une stimulation de la synthèse de 3,5-DCQ dans les conditions d'azote limitant. La teneur en 3,5-DCQ est plus élevée que le contrôle dès 7 jours (sauf essai 2), puis augmente jusqu'à un maximum atteint à 14 jours. Pour l'essai 2 (Figure 37b), les valeurs sont considérablement plus élevées atteignant un seuil de 8,7% +/-1% (g de 3,5-DCQ/100g de matière sèche), alors que les valeurs obtenues en production chez PAT sont autour de 3 à 4% (Annexe 13). La réponse des plantes au stress est donc quelque chose d'extrêmement variable ce qui est un fait établi de longue date pour ce qui concerne le métabolisme secondaire.

Ces analyses phytochimiques nous montrent qu'une diminution de l'apport en azote provoque chez les plantes une stimulation de la synthèse d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ. Ces résultats sont similaires à une étude montrant que la carence azotée induit une accumulation d'acides phénoliques dont les plus abondants sont l'acide chlorogénique et le 3,5-DCQ chez l'achillée (Galieni *et al*., 2015). Cette stimulation peut être la conséquence de deux causes. D'une part, il est bien connu que les stress environnementaux tels qu'une carence azotée peuvent augmenter la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) (Kovacik *et al*., 2007). Pour se protéger des dommages oxydatifs, les plantes ont développé des mécanismes de détoxification comme la synthèse de ces composés phénoliques jouant un rôle dans la neutralisation des radicaux libres et autres espèces oxydatives (Grace et Logan, 2000).

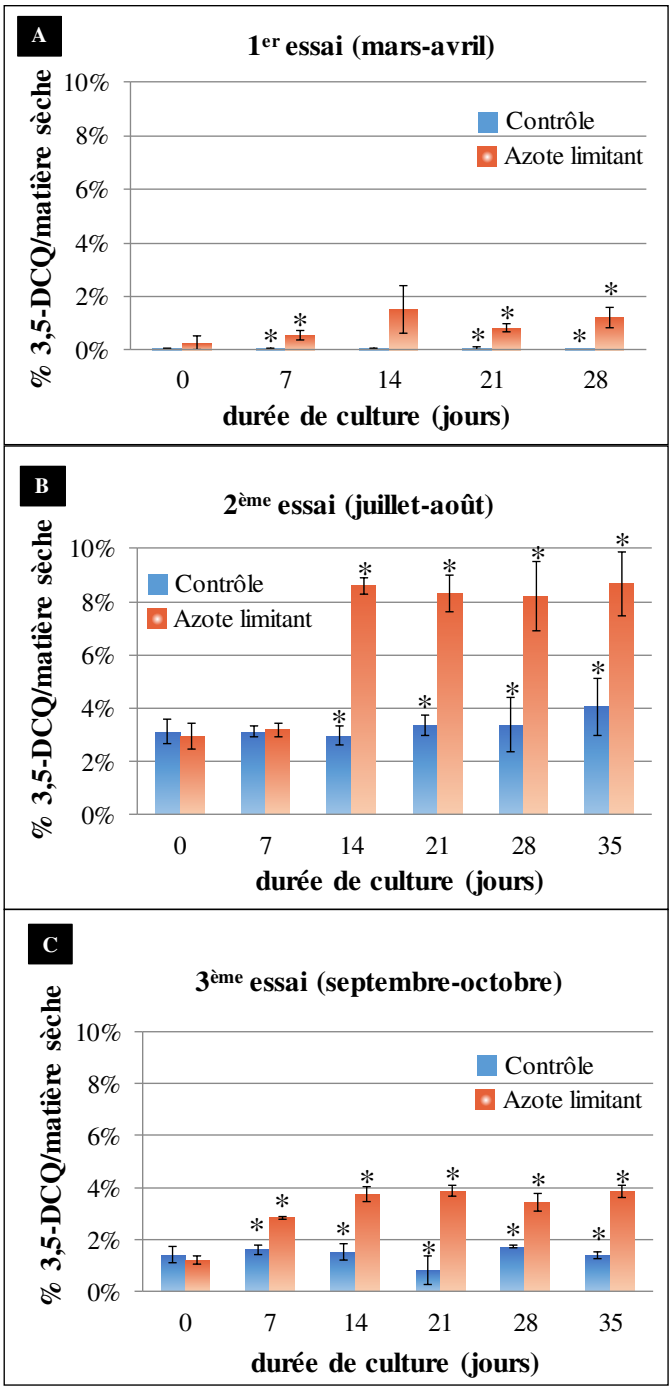


Figure 37 : Teneurs en acide 3,5-dicaféoyl-quinique dans des extraits hydro-éthanoliques de racines d'ipomée. Unité en ordonnée exprimée en % : g de 3,5-DCQ pour 100g de matière sèche (extrait lyophilisé). Les barres d'erreur représentent les écart-types (n=3). Statistiques réalisées avec un test de Student (valeur p < 5%). A, B et C : répétitions expérimentales.

Une autre raison peut expliquer ce résultat. Cette augmentation semble également résulter d'un changement d'équilibre carbone-azote dans la plante (Gebauer *et al.*, 1998; Leser et Treutter, 2005). Le métabolisme secondaire est dirigé vers la synthèse des métabolites riches en carbone comme les phénylpropanoïdes au détriment des métabolites riches en azote comme les alcaloïdes, lorsque l'approvisionnement en azote est insuffisant.

Ainsi, nous avons pu obtenir des plantes surproductrices d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ en les cultivant en situation de stress azoté. L'obtention de matériel très contrasté au niveau des profils métaboliques nous a permis d'entreprendre une analyse différentielle de l'expression de certains gènes potentiellement impliqués dans la production de ces molécules d'intérêt.

1.3.3 Etude corrélative entre l'expression des gènes d'intérêt et la synthèse des métabolites cibles dans les racines d'ipomée

En partant de l'hypothèse qu'il y a une relation entre le niveau d'expression des gènes impliqués dans la synthèse de DCQ et la concentration de ces molécules, nous avons initié une analyse quantitative des ARNm correspondant aux différents gènes dans les tissus contrastés du point de vue phytochimique. En s'appuyant sur les résultats commentés précédemment, nous avons sélectionné les plantes à 21 jours de culture (sous l'effet d'un stress azoté) en parallèle avec les plantes contrôle qui présentaient les différences les plus significatives pour les trois saisons (Figure 38). Même si les différences sont aussi significatives au-delà de cette durée de culture, on peut supposer que ces fortes teneurs résultent non plus de la synthèse mais d'une accumulation de ces composés et donc on ne peut exclure une éventuelle diminution des ARNm des gènes d'intérêt.

Globalement, on remarque que l'expression des gènes est très variable entre les différents échantillons et d'une expérimentation à l'autre (Figure 38). Il est probable qu'après 21 jours de culture, la quantité d'ARNm soit liée non plus à la synthèse des ARNm mais à l'accumulation des ARNm. Bien souvent, l'expression des gènes est induite en amont de la synthèse des métabolites. Pour vérifier que nous sommes bien dans la phase de synthèse des ARNm, nous pourrions mesurer l'expression des gènes dans des tissus prélevés plus précocément comme à 14 jours où l'on note un début d'augmentation de la production de 3,5-DCQ. Une mesure en cinétique de qPCR en parallèle avec un dosage des métabolites à différentes heures sur un jour fixe pourrait permettre de cibler plus précisement la phase de synthèse des ARNm corrélée à la production de 3,5-DCQ.

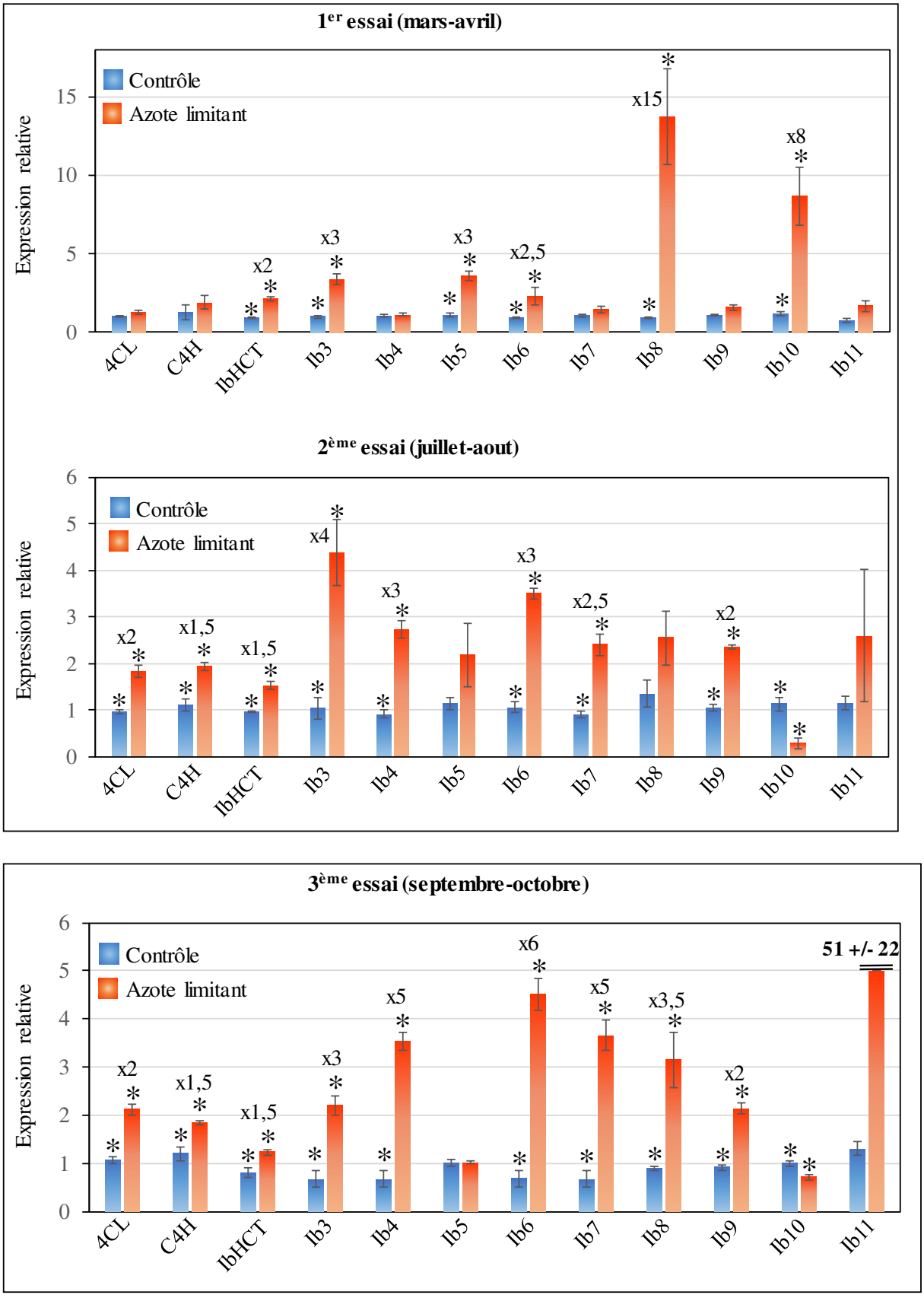


Figure 38 : Niveaux d'expression relative des gènes candidats issus de la banque d'ADNc de PAT et des gènes de la voie des phénylpropanoïdes dans les racines d'Ipomoea batatas. 4CL : AB469557 ; C4H : GQ373157.2. Les barres d'erreur représentent les écart-types (n≥ 3).

Statistiques réalisées avec un test de Student (valeur p < 5%). Barres en bleu : contrôle ; barres en rouge : azote limitant.

Nous avons étudié le niveau d'expression des gènes impliqués dans la synthèse des dérivés d'acide chlorogénique. Parmi les gènes déjà identifiés chez l'ipomée, on trouve les gènes codant la C4H et la 4CL. Nous nous sommes donc focalisés sur ces gènes. Dans l'essai 1, leur expression est inchangée dans les deux conditions (Figure 38), mais cela peut venir des variations de teneur en acide chlorogénique observées au jour 21 (Figure 37a). Dans les essais 2 et 3, leur expression est 1,5 à 2 fois plus forte par rapport au contrôle, ce qui va dans le même sens que la synthèse d'acide chlorogénique (Figure 36b et 1c). Ces observations sont cohérentes avec une étude montrant que les transcrits de ces gènes sont positivement corrélés à la teneur en acide chlorogénique chez *Lonicera macranthoides* (Chen *et al*., 2015).

La C4H et la 4CL interviennent dans la synthèse du *p*-coumaroyl-CoA à l'origine de plusieurs familles de composés phénoliques. A partir de ce précurseur, les enzymes clés agissant en amont de la biosynthèse de l'acide chlorogénique sont l'HCT et l'HQT. Plusieurs articles mettent en évidence une corrélation entre l'expression des gènes codant ces enzymes et la synthèse d'acide chlorogénique (Niggeweg *et al*., 2004; Sonnante *et al*., 2010; Chen *et al*., 2015). En revanche, la relation au niveau transcriptionnel avec la synthèse de 3,5-DCQ n'a pas été clairement définie. Nous avons alors analysé le profil d'expression de ces gènes sur des ipomées surproductrices de 3,5-DCQ. Nous constatons que dans ces plantes, le niveau de transcrits d'*IbHCT* est 1,5 à 2 fois supérieur à celui des plantes contrôle à teneur plus faible en 3,5-DCQ. Ces résultats sont observés dans les 3 répétitions expérimentales. Le même cas de figure se présente pour d'autres gènes étudiés dans ce travail, c'est-à-dire une augmentation du niveau d'expression par rapport au control pour les gènes *Ib3* (3 à 4 fois supérieur), *Ib6* (2,5 à 6 fois supérieur), et ce dans les 3 essais. Les gènes *Ib4* et *Ib7* montrent un profil d'expression similaire qui se traduit par un nombre de transcrits de 2,5 à 5 fois plus élevé que le control dans les essais 2 et 3. Ces gènes sont regroupés dans le même cluster sur l'arbre phylogénétique (Figure 30). On peut supposer que ces gènes analogues aient des rôles similaires en lien avec la synthèse de 3,5-DCQ. On peut également voir que le niveau d'expression du gène *Ib9* est significativement (pour les essais 2 et 3) plus fort (d'un facteur 2) dans les tissus riches en 3,5-DCQ. Du point de vue phylogénétique, *Ib3* et *Ib9* sont très proches et leurs profils d'expression sont similaires. Il est possible que ces gènes jouent parallèlement un rôle dans la synthèse de 3,5-DCQ.

Les autres gènes ont des profils d'expression différents. C'est le cas pour le gène *Ib5* dont le niveau d'expression n'est significatif ni dans l'essai 2 ni dans l'essai 3, pouvant indiquer que l'expression de ce gène n'est pas directement reliée à la synthèse de 3,5-DCQ. De plus les gènes *Ib8* et *Ib11* ont une expression très variable entre les 3 essais, donc il semble que ces gènes s'expriment indépendamment de la synthèse de 3,5-DCQ.

Si nous avons remarqué une corrélation entre l'expression de certains gènes et la synthèse de 3,5-DCQ, nous constatons que le gène *Ib10* est un cas d'exception. Celui-ci s'exprime fortement (jusqu'à 8 fois) dans le premier essai dans la condition stress, alors que son expression

est plus faible que le contrôle dans les essais 2 et 3. L'expression de ce gène ne semble pas dépendre de la synthèse des acides caféoyl-quiniques.

Concernant les gènes *IbHQT* et *IbHCBT*, aucune différence d'expression n'est notée entre les deux conditions pour les essais 2 et 3 (Figure 39). Ces résultats vont à l'encontre de ce qui a été démontré chez d'autres espèces où la quantité de CGA est positivement corrélée à l'expression de *HQT* (Joet *et al*., 2010; Chen *et al*., 2015). Néanmoins les résultats sur *IbHCBT* sont plus plausibles puisque la fonction des HCBT est plus affiliée à la synthèse d'esters volatils et d'anthranilates qu'à la synthèse d'acide chlorogénique (Yang *et al*., 1997; D'Auria *et al*., 2002a).

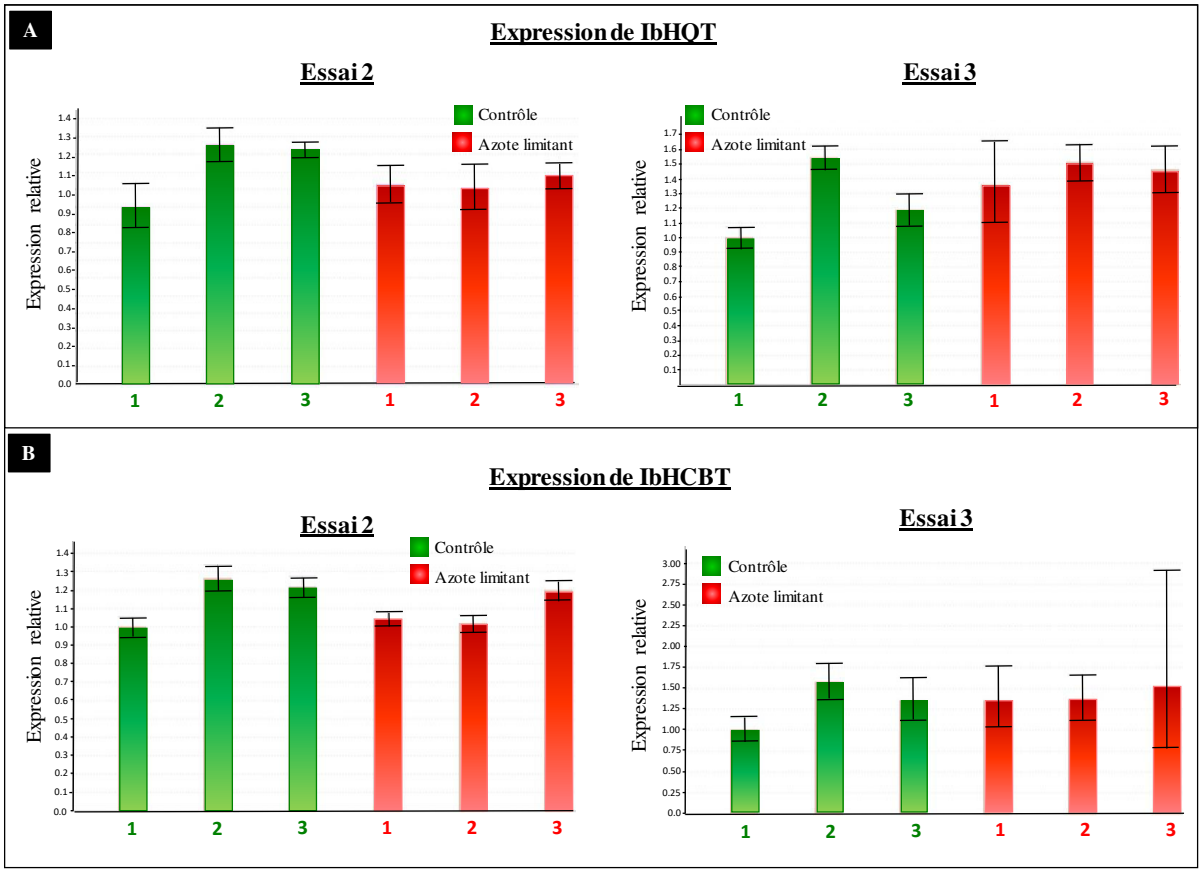


Figure 39 : Profil d'expression des gènes IbHQT et IbHCBT dans les racines d'Ipomoea batatas. Comparaison des conditions « contrôle » et « azote limitant ». 1, 2, 3 : N° de la plante analysée.

Parmi les 10 gènes candidats testés, seule l'expression de certains semble être corrélée à la synthèse de 3,5-DCQ. Ces gènes peuvent être classés par rapport à leur niveau d'expression dans l'ordre croissant suivant : Ib7>Ib6>Ib4>IbHCT>Ib3>Ib9. Il semble que ces gènes soient les meilleurs candidats impliqués dans la synthèse de 3,5-DCQ. Afin de comprendre la fonction de ces gènes, nous avons initié une étude enzymatique *in vitro* en

exprimant les protéines recombinantes correspondantes dans des systèmes d'expression hétérologue.

1.4 Clonage des séquences codantes et expression des protéines recombinantes

Pour exprimer les protéines recombinantes et étudier leur fonction *in vitro*, nous avons choisi de cloner les différents gènes dans des plasmides d'expression bactérien. Les séquences codantes ont été récupérées à partir de notre banque RNAseq d'ipomée. Les ARN ont été extraits à partir de racines de plantes stressées à l'azote et les fragments correspondant aux séquences candidates (Tableau 12 : Amorces spécifiques des séquences candidates d'Ipomoea batatas pour le clonage dans les plasmides d'expression. Tm calculé avec la formule mathématique ou avec le logiciel OligoCalc.) ont été amplifiés par RT-PCR. L'amplification du gène *Ib3* n'a pas fonctionné soit parce que le gène n'est pas assez exprimé dans les conditions de préparation de l'échantillon soit parce que les conditions de PCR n'étaient pas adaptées. Les gènes *Ib4*, *Ib6* et *Ib7* sont en cours de clonage dans le pCR8. Les cDNA d'*Ib9* et *IbHCT* ont été d'abord sous-clonés chacun dans le pCR8 puis clonés dans le pET28b entre les sites de restriction *Bam*HI et *Xho*I pour le gène *Ib9* et entre les sites *Nde*I et *Xho*I pour le gène *IbHCT*. Après vérification de l'insertion du transgène dans le plasmide, les constructions plasmidiques ont été incorporées dans la souche d'*E. coli* BL21 (DE3) par transformation chimique. En parallèle, des bactéries de la souche Rosetta 2 ont été transformées avec le plasmide pET3a contenant le gène codant l'HCT de *Cynara cardunculus* (CyHCT). Comme il a été décrit auparavant que cette protéine était impliquée dans la synthèse d'acide chlorogénique et d'acide dicaféoyl-quinique (Comino *et al*., 2007), nous l'avons utilisée comme témoin positif pour vérifier l'activité enzymatique des protéines testées.

Après sélection en présence d'antibiotique, les bactéries ayant incorporé le plasmide portant le gène d'intérêt ont été vérifiées soit par digestion enzymatique soit par PCR. L'insertion du gène est confirmée par la présence d'une bande autour de 1300pb qui correspond à la taille de l'amplicon attendu (1316pb) (Figure 40a).

Pour sélectionner les bactéries transformées avec la construction pET28b-*IbHCT*, le plasmide a été extrait de la bactérie puis digéré avec les enzymes *Bam*HI et *Xho*I. Comme le montre la Figure 40b, le poids moléculaire apparent de la bande issue de la digestion est approximativement de 1300pb, ce qui est cohérent avec la taille attendue de l'insert (1296pb). En parallèle, des bactéries ont été transformées avec le plasmide vide (non recombiné) afin de comparer l'activité des protéines d'intérêt avec un témoin négatif.

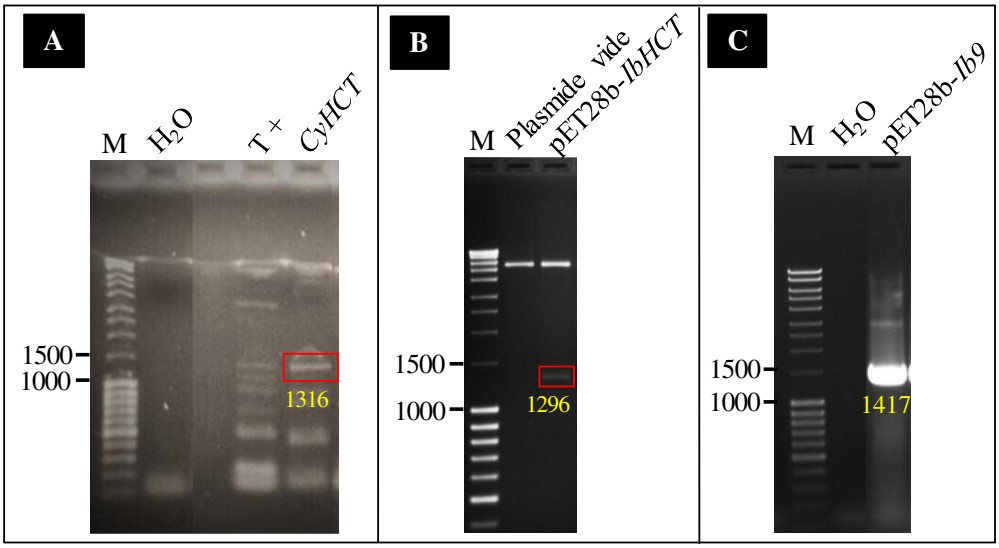


Figure 40 : Vérification de l'insertion du gène d'intérêt après transformation d'Escherichia coli.

- ➔ *A : transformation d'E. coli Rosetta avec pET3a-CyHCT ; PCR directe sur colonie avec les amorces Directe et Reverse du gène CyHCT.*
- ➔ *B : transformation d'E. coli BL21 avec pET28b-IbHCT. Digestion enzymatique avec BamHI et XhoI sur le plasmide extrait des bactéries.*
- ➔ *C : transformation d'E. coli BL21 avec pET28b-Ib9. PCR sur le plasmide extrait des bactéries. Amplification avec les amorces Directe et Reverse du gène Ib9.*

Pour les bactéries transformées avec la construction pET28b-*Ib9*, la présence de l'insert a été vérifiée par PCR. Comme présenté dans la Figure 40c, la bande visible au poids moléculaire apparent de 1400pb correspond à la taille théorique de l'amplicon (1417pb).

Les gènes isolés ont été ensuite séquencés pour savoir si leur séquence est différente de celle prédite de la banque RNA seq. Le séquençage a été réalisé après trois clonages indépendants. Nous avons traduit *in silico* la nouvelle séquence obtenue et l'avons comparée par alignement BLAST avec celle de départ et avec des séquences d'HCT disponibles sur Genbank. Dans la nouvelle séquence d'IbHCT, on note qu'il y a 9 changements d'acides aminés par rapport à la séquence initiale et 6 acides aminés différents par rapport à celle de la base de données NCBI (Figure 41). Les trois résultats de séquençage étaient identiques. Il est donc possible que des erreurs provenant du pyro-séquençage lors de la création de la banque RNA seq soient à l'origine de ces différences. Cette nouvelle séquence présente 85 mésappariements avec la séquence d'HCT d'artichaut et 60 mésappariements avec celle de café. Ces changements d'acide aminés sont susceptibles de modifier la spécificité du substrat ainsi que les caractéristiques enzymatiques d'une HCT à l'autre.

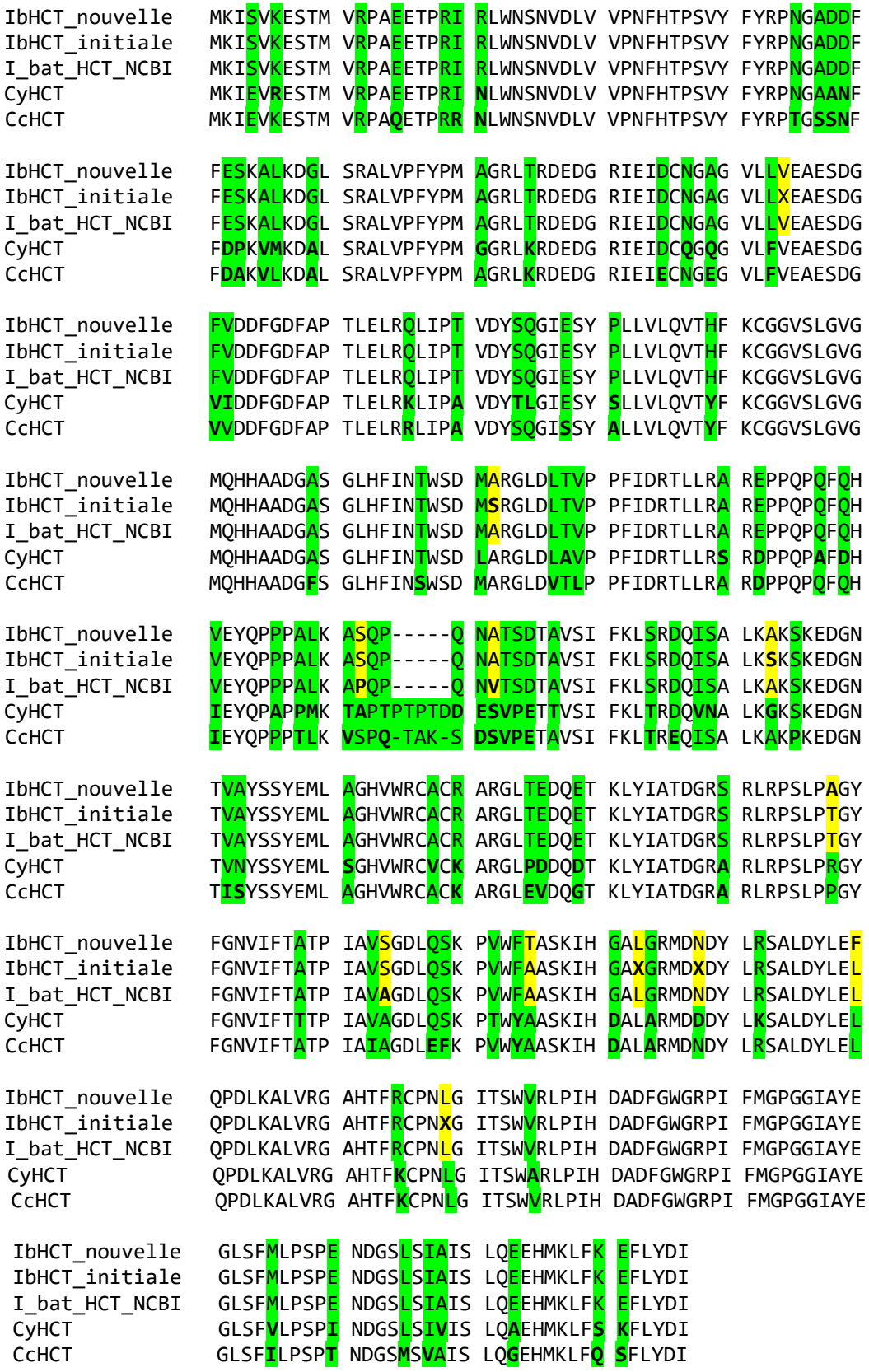


Figure 41 : Alignement des séquences protéiques des HCT d'ipomée (séquences PAT initiales et nouvelles) et celle de la Genbank (ID : AB047805) et des HCT de café (ID : AB047805) et d'artichaut (ID : AAZ80046) répertoriées chez Genbank. En vert : régions variables entre les

HCTs. En jaune : régions variables entre la nouvelle séquence d'IbHCT, la séquence initiale et la séquence NCBI (Genbank ID : BAJ14794).

Nous avons également fait une analyse BLAST entre la nouvelle séquence 9 et la séquence prédite de départ après le clonage de la séquence dans un plasmide pCR8. On remarque que les deux séquences sont quasiment identiques avec seulement 3 changements d'acides aminés (Figure 42).

```
Ib09_nouvelle   MVWSFPPRFS IKLSRPELVP PKSPTPKEKK ALSDLDDQAS LRYQMPGLWF
Ib09_initiale   MVWSFPPRFS IKLSRPELVP PKSPTPKEKK ALSDLDDQAS LRYQMPGLWF

Ib09_nouvelle   YENKESMVGR DPAAVIKEGL GKALVFYYPL AGRLIEGPNK KLIVDCNGEG
Ib09_initiale   YENKESMVGR DPAAVIKEGL GKALVFYYPL AGRLIEGPNK KLIVDCNGEG

Ib09_nouvelle   VLFLKAEANI ALHKLGDFIH SPSPYLSKLQ YNVPGSQGIT GCPLLLIQVT
Ib09_initiale   VLFLKAEANI ALHKLGDFIH SPSPYLSKLQ YNVPGSQGIT GCPLLLIQVT

Ib09_nouvelle   RFTCGGIALG VRLNHTMVDG YGMVLFLKAL CELALGGSMP SVLPVWDREM
Ib09_initiale   RFTCGGIALG XRXNHTMVDG YGMVLFLKAX CELALGGSXP SVLPVWDREM

Ib09_nouvelle   LSATANPNPT CSHALYEAPC FRNNFKLFDF EWWANKIFNV EKLASQPLFF
Ib09_initiale   LSATANPNPT CSHALYEAPC FRNNFKLFDF EWWANKIFNV EKLASQPLFF

Ib09_nouvelle   FFPKILKPIF VQSSFIVGPK EIQALRDQAI AQDYGRCTTF ELITACLWKC
Ib09_initiale   FFPKILKPIF VQSSFIVGPK EIQALRDQAM AQDYGRCTTF ELITACLWKC

Ib09_nouvelle   RTIALQPYPN ATVRLTFPTD MRQKSLEGLK LSPGYYGNAI VMQSATSTAK
Ib09_initiale   RTIALQPNPN ATVRLTFPTD MRQKSLEGLK LSPGYYGNAI VMQSATSTAK

Ib09_nouvelle   LLCDSPITYA IQLIREAKNK VNVDYVKSVI DFMVTRGRPR MSVLRNMLVS
Ib09_initiale   LLCDSPITYA IQLIREAKNK VNVDYVKSVI DFMVTRGRPR MSVLRNMLVS

Ib09_nouvelle   DISRIGMEKI DFGWGDAIYA GASIAAYGAT FLERPKSSDS TTEKSILVPI
Ib09_initiale   DISRIGMEKI DFGWGDAIYA GASIAAYGAT FLERPKSSSS TTEKSILVPI

Ib09_nouvelle   SLPHIYMQIF THEFKKMTNS S
Ib09_initiale   SXPHIYMQIF THEFKKMTNS S
```

Figure 42 : Alignement des séquences protéiques de la nouvelle et de l'ancienne séquence d'Ib9. En jaune : régions variables entre les HCT d'ipomée.

Ces modifications d'acides aminés peuvent être la conséquence de mutations liées au clonage ou bien à des erreurs du pyro-séquençage lors de la création de la banque RNAseq.

1.5 Conclusion relative à la sélection des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse du 3,5-DCQ

Dans cette première partie, nous avons réalisé une sélection plus affinée des 13 gènes candidats pour le rôle dans la synthèse du 3,5-DCQ. L'analyse phylogénétique montre que les séquences

peptidiques déduites *in silico* font partie de la famille des acyltransférases BAHD. Les 13 séquences montrent des différences importantes au niveau de leur séquence peptidique, allant de 21 à 94% d'identité entre elles. Ces gènes partagent des séquences consensus avec des acyltransférases de la famille des BAHD comme le motif HXXXD. Par des approches de bioinformatique, nous avons pu identifier des séquences très proches avec des HCT et des HQT impliquées dans la synthèse des dérivés d'acides caféoyl-quiniques. Grâce à l'analyse par BLAST, les séquences 1, 2 et 3 ont été respectivement identifiées comme étant une HCT, une HQT et une HCBT. Des gènes analogues de la même espèce sont répertoriés dans Genbank mais leur fonction n'a pas encore été caractérisée. Les séquences peptidiques d'IbHCT et d'IbHQT étudiées dans ce travail présentent respectivement 85% et 83% d'identité avec l'HCT de café et l'HQT de tomate dont le rôle a été récemment décrit dans la synthèse de DCQ (Lallemand *et al*., 2012; Moglia *et al*., 2014). Ces gènes représentent donc une piste intéressante pour élucider la voie de biosynthèse de DCQ chez l'ipomée. Cela nous a conduits à la question suivante : si l'on stimule la production de 3,5-DCQ, est-ce que l'expression de ces gènes est aussi augmentée ?

Pour y répondre, nous avons établi des conditions de culture optimales à la production de 3,5-DCQ dans la plante. Nous avons vu qu'en cultivant en condition d'azote limitant, nous avons obtenu des plantes surproductrices de 3,5-DCQ et d'acide chlorogénique.

Plusieurs études mettent en évidence un lien étroit entre la synthèse des acides caféoyl-quiniques et les gènes au niveau transcriptionnel (Comino *et al*., 2007; Koshiro *et al.*, 2007; Chen *et al*., 2015). Afin d'identifier les gènes dont l'expression est corrélée à la synthèse de 3,5-DCQ chez l'ipomée, nous avons procédé à des analyses de transcriptomique ce qui a permis de trier un certain nombre de gènes. Nous avons mis en évidence que l'expression des gènes *Ib3*, *4*, *6*, *7*, *9* et *IbHCT* est coordonnée avec la synthèse de 3,5-DCQ. Cependant, les protéines correspondantes ne font pas partie du même clade d'après l'arbre phylogénétique, suggérant des rôles différents dans la synthèse de 3,5-DCQ. Leur implication peut être plus ou moins directe dans cette voie de biosynthèse. Par exemple, d'autres enzymes peuvent entrer en jeu comme la C3'H dont on a déjà décrit son rôle chez *Arabidopsis thaliana* (Schoch *et al*., 2001).

Notons que sur le premier essai expérimental, les teneurs en acide chlorogénique et en 3,5-DCQ ainsi que le niveau d'expression des gènes étaient considérablement plus faibles que les autres essais. Il s'agit ici d'un effet environnement (température, luminosité, hygrométrie, etc…) et non lié au génotype de la plante puisque toutes ces plantes proviennent de la même plante mère.

Afin d'étudier la fonction de ces gènes, nous avons utilisé une approche de clonage moléculaire dans un système hétérologue bactérien en utilisant *E. coli* comme modèle. Les gènes *IbHCT* et *Ib9* ont été clonés dans le plasmide d'expression pET28b afin de produire la protéine recombinante. En analysant la séquence isolée de ces gènes, nous avons relevé des différences entre la séquence réellement clonée et la séquence initialement prédite de la banque RNAseq. La substitution d'un acide aminé par un autre peut avoir une incidence sur la conformation de

la protéine ce qui peut modifier l'activité de l'enzyme. Il est donc nécessaire de s'assurer que la protéine produite est fonctionnelle.

2 Chapitre 2 : Etude et caractérisation fonctionnelle *in vitro* de l'HCT d'ipomée

2.1 Synthèse des substrats *via* la 4-coumarate : coenzyme A ligase (4CL)

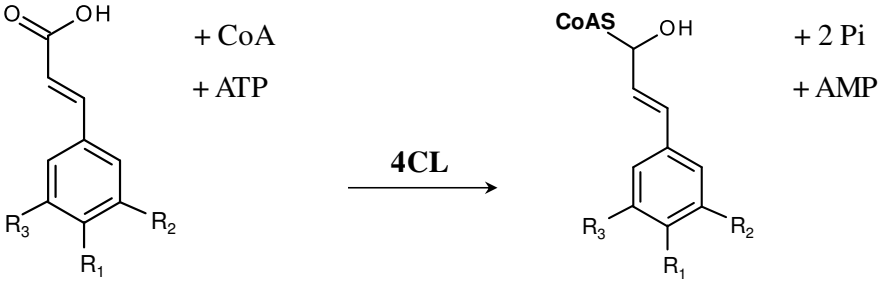
2.1.1 Une alternative économique de production des esters d'acide hydroxycinnamique

Molécule	Numéro CAS	Masse moléculaire (g/mol)	Laboratoire vendeur	Prix ($ ou €) (pour 1g)
Esters de coA				
Caféoyl-CoA	53034-79-0	929,68	TransMIT GmbH (A)	41,25k€
4-coumaroyl-CoA	119785-99-8	913,67	TransMIT GmbH (A)	41k€
Cinnamoyl-CoA	30801-99-1	897,68	TransMIT GmbH (A)	25,8 k€
Féruloyl-CoA	30802-02-9	943,70	MicrocombichemNAT e.K (A); TransMIT GmbH (A)	1,95-25,8k€
Acides hydroxy-cinnamiques				
4-O-coumaroylquinate	934391-78-3	338,12	Molport (A)	247 k$
4-O-coumaroylshikimate	nd	320,29	Endotherm Gmbh (A)	6,25k€
5-O-caféoylquinate	327-97-9	354,31	Sigma –Aldrich; TransMIT (A)	85€-11,2k€
5-O-caféoylshikimate	73263-62-4	336,29	Cambridge Chemical Products (US)	73 k$
4-O-cinnamoylquinate	5509-70-6	322,31	nd	nd
4-O-cinnamoylshikimate	nd	304	nd	nd
3-féruloylquinate	1899-29-2	368,32	Chem Faces Biochemical Co. (C)	88,8 k$
féruloylshikimate	nd	336	nd	nd
Acides dicaféoylquiniques (3,4-, 1,3-, 3,5-DCQ)	2450-53-5	516, 45	TransMIT; Sigma Aldrich	18-188 k€

Tableau 29 : Etude prospective des molécules sur le marché. nd : non disponible ; A: Allemagne; US: United States; C: Chine.

Les HCTs sont impliquées dans la synthèse d'acides hydroxycinnamiques à partir d'esters de coenzyme A. Ainsi les thiolesters d'acides *p*-coumarique, caféique, férulique et plus rarement d'acide sinapique, sont les précurseurs de métabolites variés, tels que les lignines, les flavonoïdes et les coumarines (Hahlbrock et Scheel, 1989). Afin d'étudier la fonction de l'HCT chez l'ipomée, nous avons testé ces divers substrats. Seulement la disponibilité de ces composés sur le marché est assez rare d'où leur coût élevé. Par exemple, le *p*-coumaroylquinate coûte 247k$ pour un gramme de molécule pure (Tableau 29). Une solution alternative consiste à

synthétiser ces molécules par voie enzymatique. L'enzyme capable de catalyser ces réactions est la 4-coumarate : coenzyme A ligase (4CL). Cette enzyme ATP-dépendante permet la formation d'esters de CoA à partir de plusieurs acides hydroxycinnamiques (Figure 43). Nous avons donc opté pour la production de ces substrats par cette méthode.



Acide hydroxycinnamique

Hydroxycinnamoyl-CoA

R_1 = OH, R_2 = R_3 = H, acide *p*-coumarique R_1 = R_2 = OH, R_3 = H, acide caféique R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3 = H, acide férulique	R_1 = OH, R_2 = R_3 = H, *p*-coumaroyl-CoA R_1 = R_2 = OH, R_3 = H, caféoyl-CoA R_1 = OH, R_2 = OCH_3, R_3 = H, féruloyl-CoA

Figure 43 : Réaction catalysée par la 4CL ou p-coumarate CoA ligase : la synthèse des esters de CoA. Les principaux substrats et produits formés par la 4CL correspondants sont encadrés.

2.1.2 Modification du protocole de synthèse des esters de CoA

La production des esters de CoA a été effectuée avec la 4CL1 isolée de *Nicotiana tabacum*. L'enzyme a été produite dans *E. coli* et purifiée par chromatographie d'affinité et dessalée (cf δ 5.3.2 et 5.3.3). L'extrait pur obtenu avait une concentration de 14mg/mL et a été utilisé pour produire les esters de CoA.

Pour synthétiser les esters de CoA, nous avons utilisé comme base le protocole décrit par Beuerle et Pichersky, 2002. Cependant, les produits formés étaient à des concentrations trop faibles pour détecter ces composés en LC-MS et les quantités d'esters de CoA étaient insuffisantes pour les utiliser comme substrats dans les tests d'incubation avec l'HCT. Il a donc été nécessaire de modifier ce protocole afin de produire plus de substrats (Tableau 30).

Composition	Protocole initial	Nouveau protocole
	Concentration finale (mM)	Concentration finale (mM)
Tampon Napi 0,1M pH7	qsp 350µL	qsp 350µL
$MgCl_2$	2,5	4
DTT	1	1,5
ATP	2,5	4
Coenzyme A	0,2	2
Substrat (ac. caféique, *p*-coumarique, cinnamique, férulique)	0,2	2
4CL	0,04 mg/mL	0,25 mg/mL
Temps d'incubation (en minutes)	20	60

Tableau 30 : Protocoles pour la synthèse des esters de CoA par la 4CL.

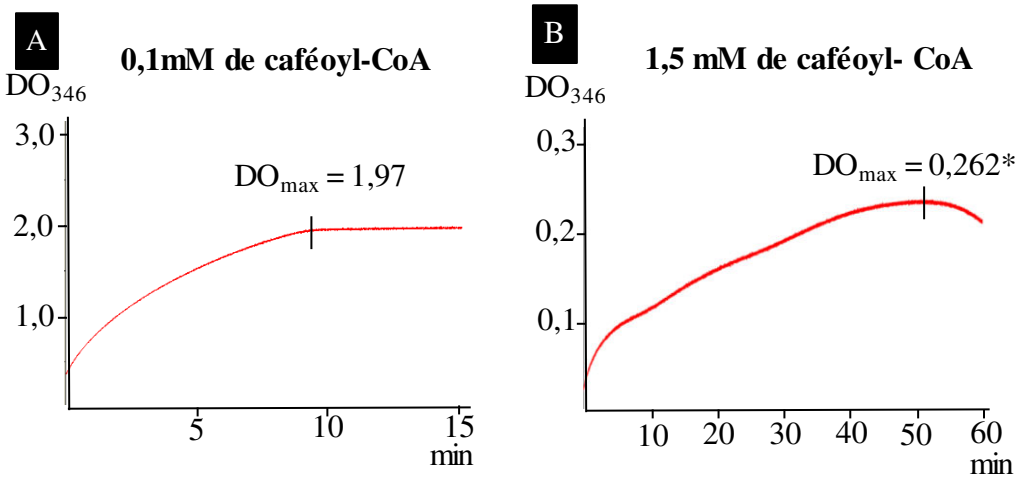


*Figure 44 : Suivi cinétique de la synthèse enzymatique du caféoyl-CoA au spectrophotomètre UV. La formation du produit est suivie à 346nm. * : DO mesurée sur l'échantillon dilué au 1/100ème. A : synthèse d'environ 0,1mM de caféoyl-CoA avec le protocole initial. B : synthèse d'environ 1,5mM de caféoyl-CoA avec le protocole modifié.*

Nous avons suivi la formation des esters de CoA par mesure spectrophotométrique au cours du temps (cf δ 7.1.2). Les courbes cinétiques reflétant l'apparition du caféoyl-CoA sont présentées sur la Figure 44. Avec l'ancien protocole, la DO maximale (1,97) du caféoyl-CoA synthétisé était atteinte au bout de 15 minutes et la concentration du produit était estimée à 0,1mM, ce qui est plus faible que celle obtenue (0,2mM) dans l'article de Beuerle et Pichersky, 2002. Ces différences peuvent venir des sources de manipulation (méthodes de quantification des protéines différentes par exemple). En améliorant ce protocole, la DO maximale est passée à

0,262 (après dilution au 1/100ème) en 50 minutes ce qui revient à une concentration de caféoyl-CoA d'environ 1,5mM (Figure 44b). 0,01mg d'enzyme ont été rajoutés quand la réaction a atteint son plateau afin de s'assurer que tout le substrat soit consommé. Mais au-delà des 50 minutes d'incubation, on constate que la courbe décline. Ceci reflète une hydrolyse de la liaison thiolester qui cause une instabilité des esters de CoA (Hoffmann, thèse 2003).

La synthèse de la molécule est également suivie par l'apparition d'une coloration jaune. Cette couleur jaune s'intensifie au fur et à mesure de l'apparition du produit, surtout pour le caféoyl-CoA et le féruloyl-CoA et très légèrement pour le *p*-coumaroyl-CoA (Figure 45). Le cinnamoyl-CoA reste cependant incolore. Cet aspect qualitatif nous indique que l'enzyme est catalytiquement active *in vitro*.

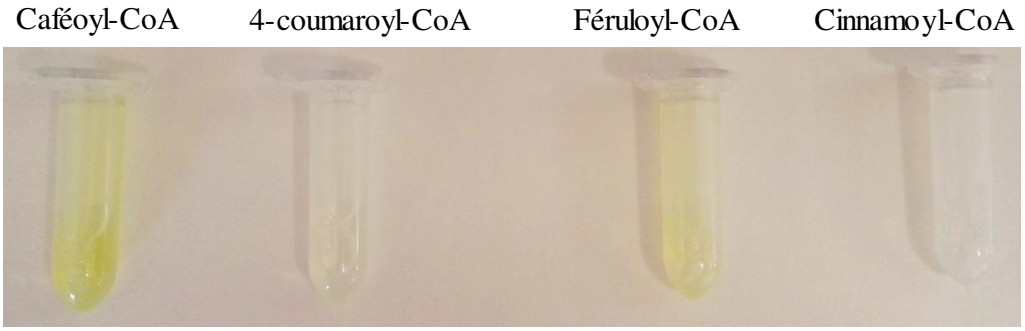


Figure 45 : Photographies des produits formés à la fin de la réaction.

Du point de vue quantitatif, les concentrations des produits ont été déterminées à partir de la loi de Beer-Lambert (A = ε x L x C) (cf δ 7.1.2). Les valeurs des coefficients d'extinction molaire (ε) ont été décrites dans la littérature (Stockigt et Zenk, 1975; Koch *et al*., 1990). Les concentrations des substrats synthétisés sont indiquées dans le Tableau 31. On remarque que dans des conditions expérimentales similaires, le *p*-coumaroyl-CoA est le produit le plus concentré (1,7 mM), suivi du caféoyl-CoA (1,5 mM), du féruloyl-CoA (1,3 mM) et enfin le cinnamoyl-CoA (0,3 mM). Cela signifie que pendant les 50 minutes d'incubation, la 4CL utilise préférentiellement comme substrat le *p*-coumarate comme cela a été mentionné par Lee et Douglas, 1996. Elle catalyse ensuite la formation du caféoyl-CoA, du féruloyl-CoA et puis du cinnamoyl-CoA. Le cinnamate est faiblement utilisé par cette enzyme, ce qui explique que la concentration est très faible.

Composé synthétisé	λ max	$DO_{mesurée}$	ε*	Concentration
	nm	UA	mM/cm^{-1}	mM
Caféoyl-CoA	346	0,262	18	1,5
Cinnamoyl-CoA	310	0,07	22	0,3
4-coumaroyl-CoA	333	0,35	21	1,7
Féruloyl-CoA	333	0,24	19	1,3

*Tableau 31 : Concentrations déterminées avec la loi de Beer-Lambert (A = ε x l x C) à partir de la densité optique (DO) mesurée par spectrophotométrie. * valeurs des coëfficients d'extinction (ε) d'après Stockigt et Zenk, 1975 et Koch et al., 1990.*

Grâce à l'amélioration de ce protocole, nous avons obtenu des esters de CoA plus concentrés qu'avec le protocole de départ (environ 0,1 mM). Cette quantité a été suffisante pour identifier les produits en LC-MS et pour réaliser les tests d'incubation avec l'HCT.

Afin de s'assurer de la qualité des esters de CoA synthétisés, nous avons réalisé une identification par HPLC.

2.1.3 Contrôle de la qualité des substrats synthétisés

Les esters de CoA ont été extraits du mélange réactionnel et analysés en HPLC avec une méthode de séparation développée au laboratoire (cf δ 7.4.1). Les produits ont été identifiés en se basant sur le spectre d'absorption dans l'UV et le temps de rétention de la molécule par comparaison avec une solution étalon préparée avec la molécule pure commerciale.

2.1.3.1 Production de caféoyl-CoA

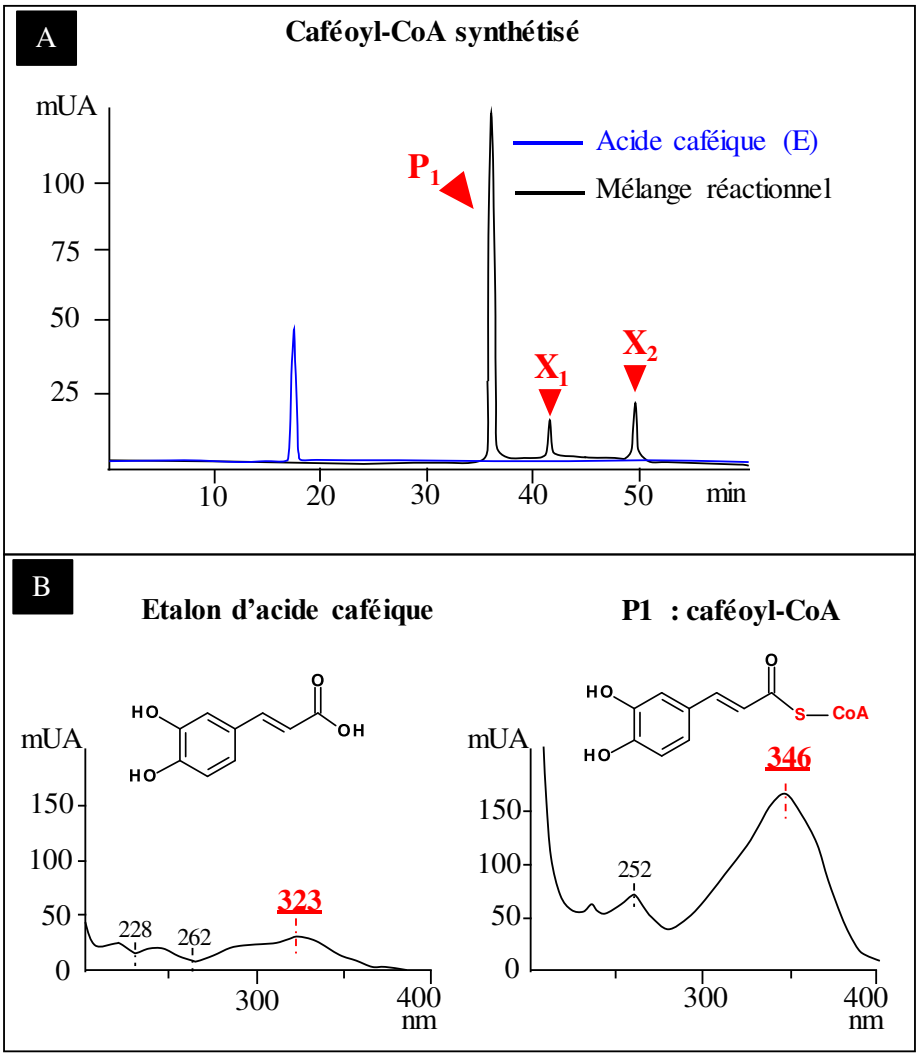


Figure 46 : Caféoyl-CoA synthétisé par la 4CL. A : Chromatogramme à 346 nm du produit final. B : Spectre UV de l'acide caféique injecté comme solution étalon (E) et spectre UV du caféoyl-CoA formé (P1).

Le chromatogramme (Figure 46a) met en évidence un pic majoritaire détecté à 36 minutes. Le spectre d'absorption (Figure 46b) de ce composé (P1) est caractérisé par deux pics d'absorption : l'un à 260nm correspondant à l'absorption de l'adénine contenue dans le coenzyme A et l'autre à 346nm correspondant à l'absorption maximale de la liaison thiolester. Ce spectre est identique à celui du caféoyl-CoA tel qu'il est décrit dans la littérature (Stockigt et Zenk, 1975; Hoffmann *et al*., 2003). Une solution étalon d'acide caféique a été analysée en parallèle et le spectre UV de la molécule montre un profil différent du caféoyl-CoA synthétisé (Figure 46b). L'acide caféique utilisé comme substrat pour la synthèse de caféoyl-CoA n'est pas détecté dans le produit final, il semble donc avoir été totalement consommé (Figure 46a). Deux autres pics minoritaires sont détectés à 42 et 49 minutes qui n'ont pas été identifiés. L'un de ces deux pics peut correspondre au coenzyme A.

2.1.3.2 Production de *p*-coumaroyl-CoA

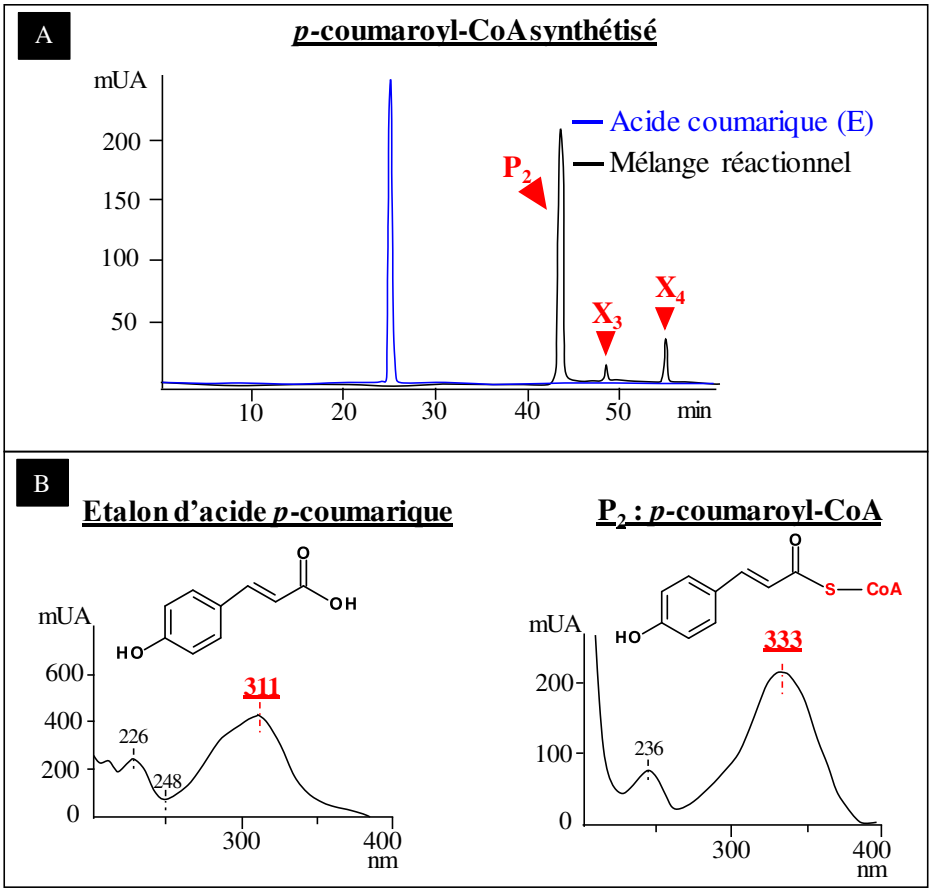


Figure 47 : p-coumaroyl-CoA synthétisé par la 4CL. A : chromatogramme à 330 nm du produit final. B : spectre UV de l'acide p-coumarique étalon (E) et du produit formé (p-coumaroyl-CoA).

Comme vu précédemment, la formation du *p*-coumaroyl-CoA a été suivie au spectrophotomètre et le produit a été séparé de l'acide *p*-coumarique par extraction liquide-liquide afin d'obtenir un composé pur (cf. δ 7.4.1). La qualité du produit a été vérifiée par une analyse HPLC. Sur le chromatogramme (Figure 47a), le produit détecté (P_2) est élué à 42 minutes. D'après la bibliographie, son spectre UV (Figure 47b) correspond au *p*-coumaroyl-CoA dont l'absorption est maximale à 333 nm, ce qui le distingue de l'acide *p*-coumarique (λ_{max}= 311 nm) (Stockigt et Zenk, 1975). Le substrat semble avoir été totalement consommé puisque l'acide *p*-coumarique n'est pas détecté (Figure 47). Les deux autres composés sont détectés comme précédemment ce qui signifie que l'extraction du composé n'est pas absolue. Cependant, le composé majoritaire correspond bien au *p*-coumaroyl-CoA.

2.1.3.3 Production de cinnamoyl-CoA

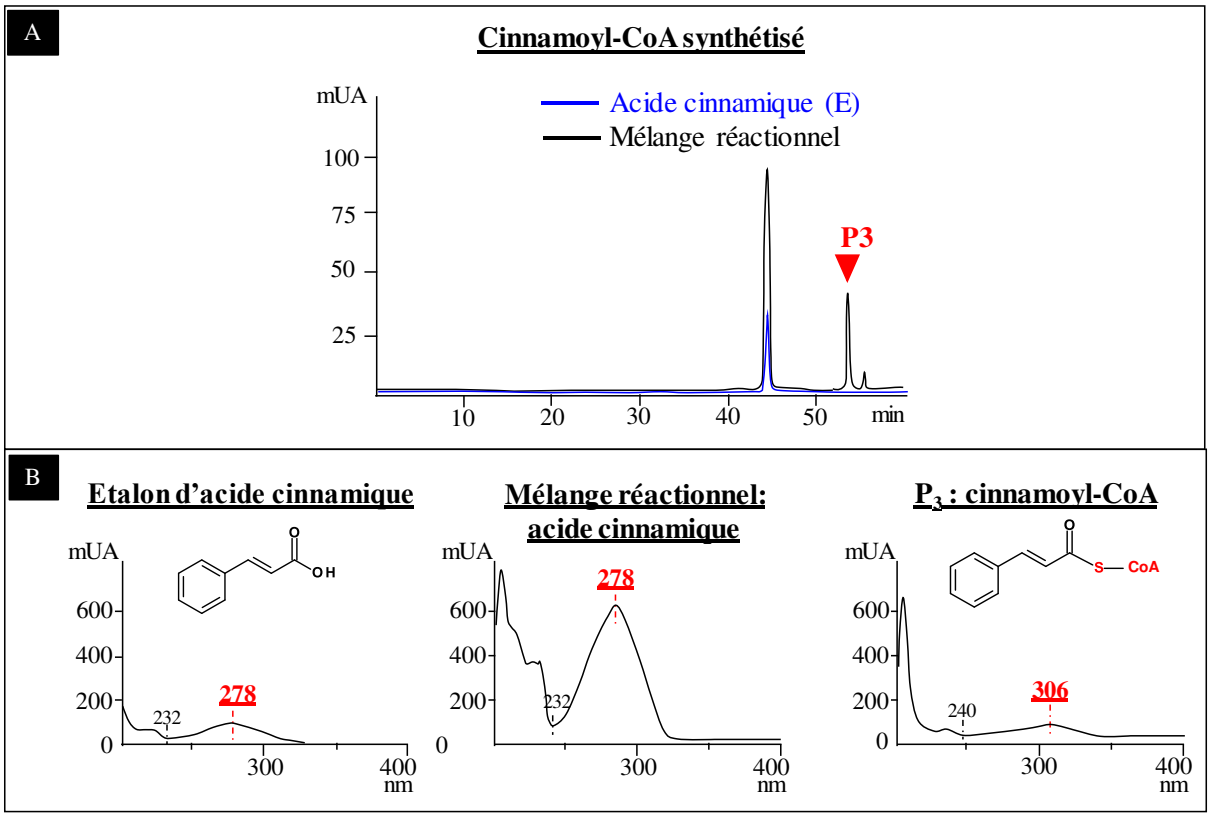


Figure 48 : Cinnamoyl-CoA synthétisé par la 4CL. A : chromatogramme à 310 nm du produit final. B : spectre UV de l'acide cinnamique étalon (E) et du produit formé (cinnamoyl-CoA).

Le chromatogramme du produit synthétisé est présenté sur la Figure 48a. Le composé majoritaire est élué en même temps (Tr ≈ 42 minutes) que l'acide cinnamique injecté comme solution étalon (Figure 48a). Les spectres UV de ces deux composés sont identiques ce qui confirme la présence d'acide cinnamique (Figure 48b). Cela signifie que le substrat n'a pas été converti entièrement en cinnamoyl-CoA et n'a pas été éliminé après extraction. Un autre composé est détecté à 53 minutes (P3). L'analyse de son spectre UV indique un pic d'absorption à 306nm alors que celui de l'acide cinnamique est de 278nm. Son spectre UV est semblable à celui du cinnamoyl-CoA décrit dans la littérature (Stockigt et Zenk, 1975). La synthèse du cinnamoyl-CoA n'est donc pas complète car la conversion du substrat en produit n'est pas totale. Cela explique pourquoi le cinnamoyl-CoA dosé au spectrophotomètre est faiblement concentré (0,3mM).

2.1.3.4 Production de féruloyl-CoA

Le chromatogramme du produit purifié est montré sur la Figure 49a. Le composé majoritaire est élué à 43 minutes et son spectre d'absorption (Figure 49b) montre un maximum à 346 nm. Ce spectre a le même profil que celui du féruloyl-CoA authentique déjà publié auparavant

(Gross *et al.*, 1973). L'acide férulique, quant à lui, est retrouvé dans l'extrait puisque le temps de rétention du pic et son spectre UV (λ_{max}= 323 nm) est semblable à celui de l'étalon (Figure 49a et b). Le féruloyl-CoA a donc bien été synthétisé, mais il reste de l'acide férulique qui n'a pas été entièrement converti.

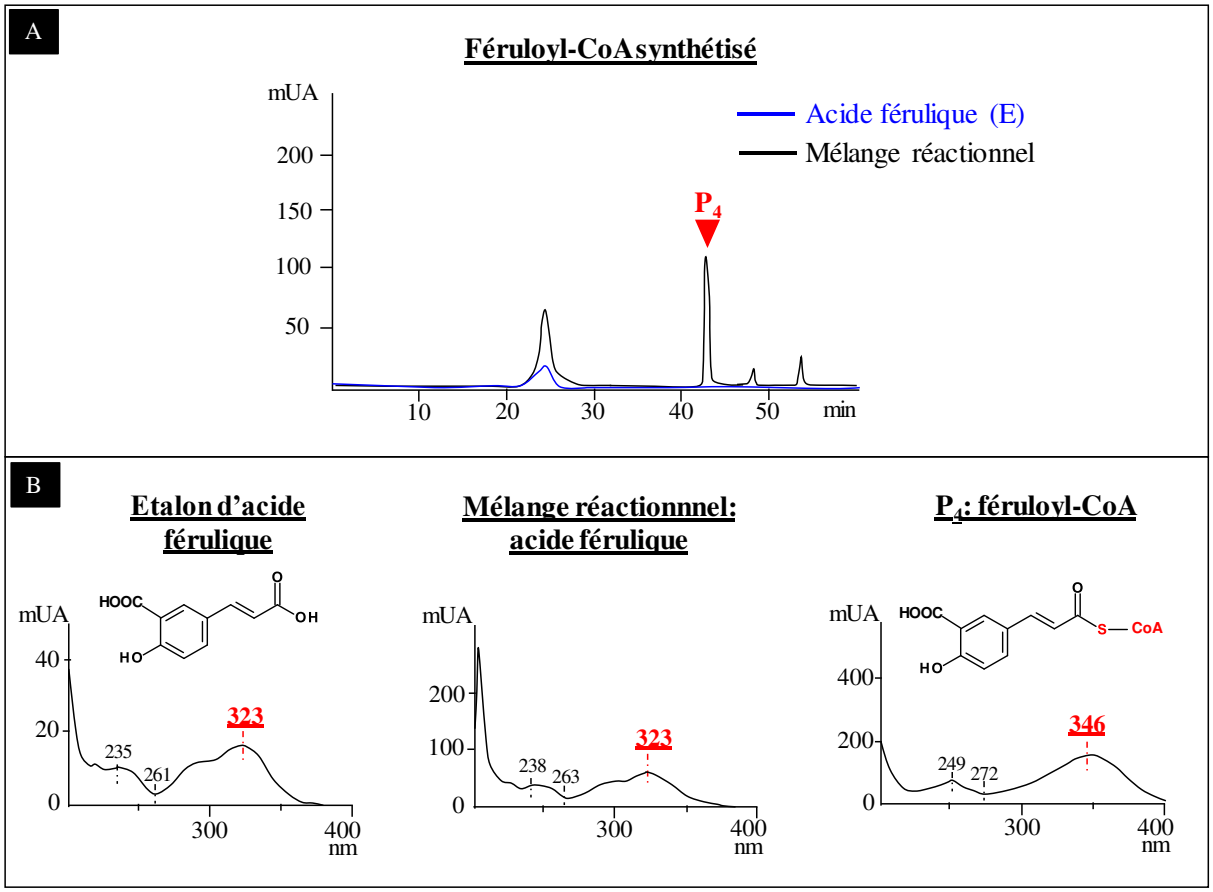


Figure 49 : Féruloyl-CoA synthétisé par la 4CL. A : chromatogramme à 346 nm du produit final. B : spectre UV de l'acide férulique étalon (E) et du produit formé (féruloyl-CoA).

La mise au point du protocole était un élément essentiel pour produire des substrats de bonne qualité et en quantité suffisante pour les purifier par extraction liquide-liquide et les détecter en HPLC. Les esters de CoA ont été synthétisés à des concentrations supérieures à celle de 0,1mM initialement obtenue. Cette quantité était nécessaire pour utiliser ces substrats dans les tests d'incubation avec les protéines recombinantes en vue de caractériser leur fonction. Cependant ces produits étant instables dans le temps à cause des réactions d'hydrolyse des liaisons thiolesters, ils sont difficilement conservables. Il a donc fallu les synthétiser extemporanément avant de réaliser les tests enzymatiques.

2.2 Expression hétérologue de l'HCT d'ipomée et de la protéine Ib9 chez *E. coli*

2.2.1 Vérification de l'expression de la protéine

Afin de vérifier l'expression de la protéine d'intérêt, nous avons d'abord recherché sa présence dans l'extrait brut (protéines totales extraites des bactéries) après séparation par SDS-PAGE. L'ensemble des protéines est représenté sur le gel (Figure 50a). On remarque que le profil protéique général est le même dans tous les extraits. L'extrait contenant la protéine IbHCT présente une bande supplémentaire à un poids moléculaire apparent d'environ 50kDa ce qui est en accord avec la taille attendue (48kDa) d'après l'estimation faite *in silico* avec l'application Expasy. Une étiquette hexa-histidine a été rajoutée à l'extrémité C-terminale permettant une détection immunologique de la protéine par Western Blot. Les résultats du Western Blot révèlent une bande à la même taille que celle observée dans le SDS-PAGE, ce qui confirme la présence de la protéine IbHCT (Figure 50b).

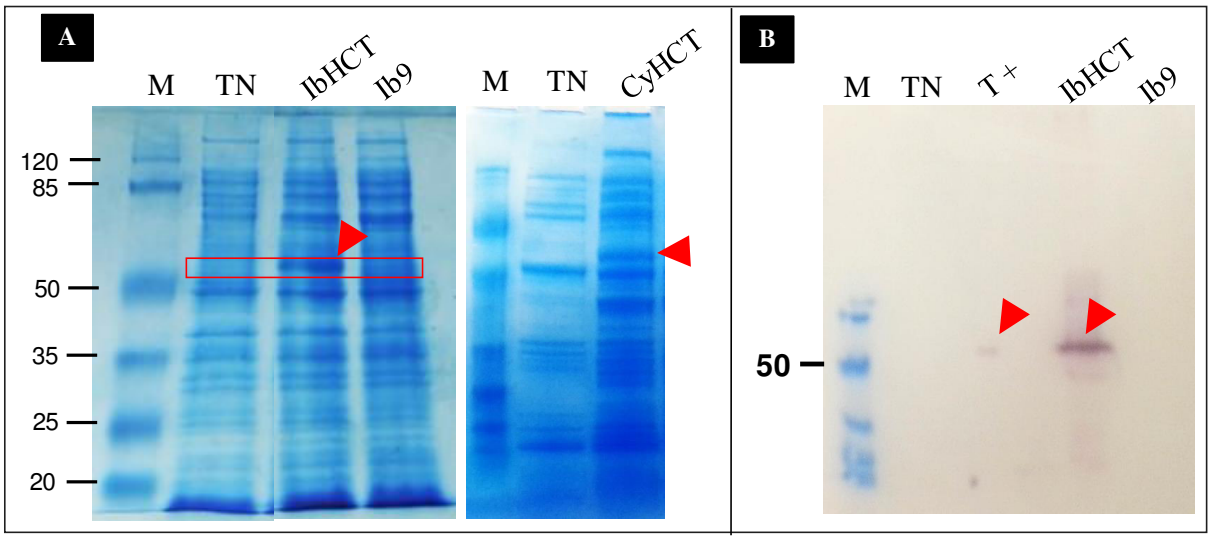


Figure 50 : Vérification de l'expression des protéines recombinantes. A) Séparation des protéines totales par SDS-PAGE dans les extraits bruts (surnageants récupérés après précipitation des bactéries lysées). TN : Témoin négatif (extrait brut à partir des bactéries transformées avec le plasmide vide). B) Western-Blot. Témoin positif : protéine portant une étiquette His^6 à l'extrémité C-terminale.

Dans l'extrait brut (surnageant récupéré après lyse des cellules et centrifugation du lysat) issu des bactéries transformées avec le gène *Ib9*, aucune différence n'est observée par rapport au témoin négatif, ni en SDS-PAGE ni en Western Blot (Figure 50). L'expression de la protéine est peut-être insuffisante pour être détectée. Pour le vérifier, nous avons réalisé une deuxième fois une transformation des bactéries BL21 et avons solubilisé le culot dans 2 mL au lieu de 4 mL de tampon NaPi0,1M pH7 comme décrit dans le protocole initial (cf δ 5.1). Nous n'avons cependant pas observé en SDS-PAGE la protéine lors de cette deuxième tentative. Deux cas de figure peuvent expliquer l'absence de la protéine. Dans le premier cas, le problème le plus

couramment rencontré lorsque le niveau d'expression des protéines chez *E. coli* est trop élevée, est la formation de corps d'inclusion constitués d'agrégats de protéines mal repliées. Ces complexes insolubles se retrouvent dans le culot avec les débris cellulaires (Villaverde et Carrió, 2003). L'autre cause possible est que le gène ne se soit pas exprimé ou que la protéine soit toxique pour la bactérie. La présence de mutations dans la séquence (cf δ1.4) peut avoir un impact sur la structure tridimensionnelle de la protéine ou sur des régions fonctionnelles de la protéine. Certains codons rares ne sont pas reconnus par les ARN-t de l'hôte ce qui peut empêcher la traduction.

En parallèle des protéines d'intérêt, nous avons exprimé l'HCT d'artichaut dans les mêmes conditions d'induction. La protéine est présente à un poids moléculaire apparent approximatif de 50 kDa (Figure 50a).

Ainsi nous avons pu produire l'HCT d'ipomée *in vitro*. Nous allons par la suite étudier l'activité de la protéine en réalisant des tests d'incubation *in vitro*.

2.2.2 Caractérisation fonctionnelle de l'HCT d'ipomée

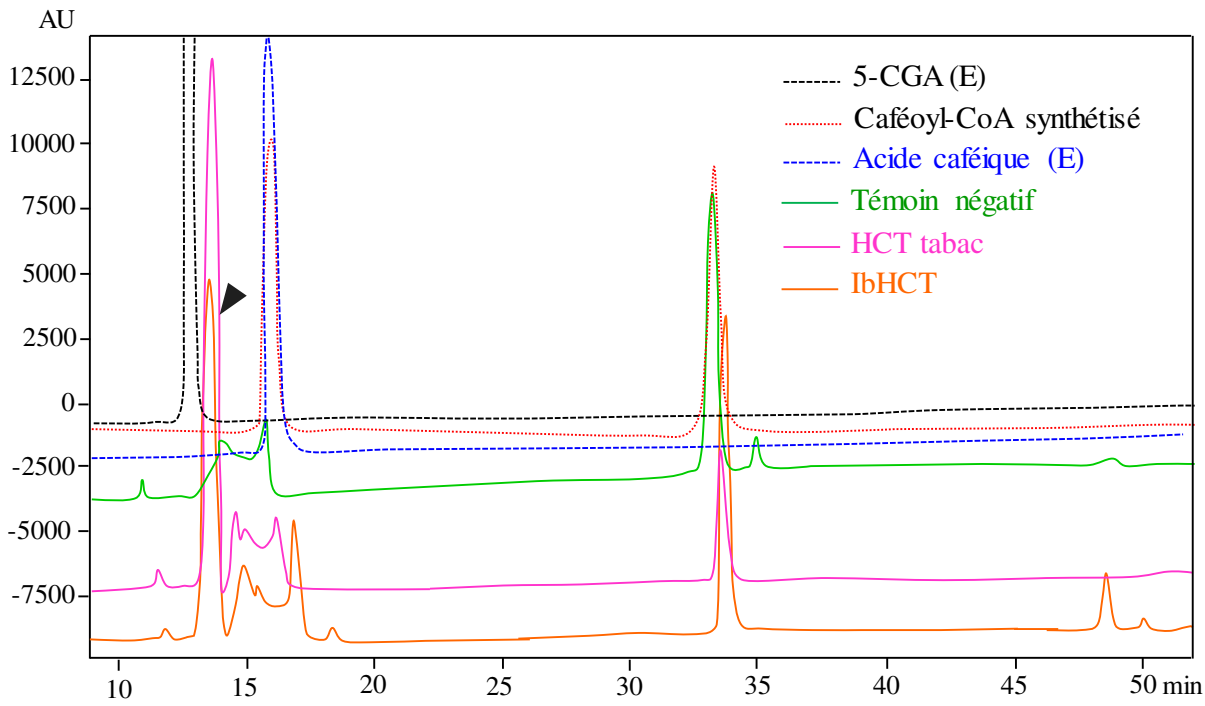


Figure 51 : Synthèse d'acide chlorogénique à partir de caféoyl-CoA et de quinate dans l'extrait brut contenant l'HCT d'ipomée. Extrait brut : surnageant récupéré après lyse des cellules bactériennes. Témoin négatif : extrait brut (protéines totales) issu de bactéries transformées avec le plasmide vide. L'extrait brut contenant l'HCT de tabac est utilisé comme témoin positif. Les étalons des substrats (5-CGA : ref. C3878 ; acide caféique : ref. C0625, Sigma-Aldrich) et du produit sont marqués en pointillés.

Dans la littérature, les HCTs ont été caractérisées fonctionnellement chez de nombreuses espèces. Par exemple, chez le café, le tabac et l'artichaut, l'expression hétérologue de ces protéines montre que l'enzyme est capable de catalyser *in vitro* la synthèse d'acide chlorogénique à partir de caféoyl-CoA et d'acide quinique (Hoffmann *et al.,* 2003; Comino *et al*., 2007; Lepelley *et al*., 2007). Comme l'HCT d'ipomée est proche de ces enzymes en termes de séquence peptidique, nous avons alors regardé si cette protéine présentait la même fonction. Afin de tester l'activité de synthèse de CGA réalisée potentiellement par l'HCT d'ipomée, nous avons réalisé des incubations avec les protéines totales présentes dans le surnageant de bactéries lysées par sonication et surproduisant l'enzyme sous le contrôle du promoteur inductible à l'IPTG. L'efficacité du système expérimental a été vérifiée en utilisant comme témoin positif l'HCT de tabac.

Les extraits protéiques ont été mis en présence de caféoyl-CoA et d'acide quinique et les produits de la réaction ont été analysés par HPLC. Les chromatogrammes sont représentés sur la Figure 51. En présence de l'enzyme IbHCT, un nouveau produit est détecté qui n'apparaît pas dans le témoin négatif. Ce pic est élué au même temps de rétention que le pic d'acide chlorogénique détecté dans la solution de référence (Figure 51). Ceci indique que l'HCT d'ipomée possède l'activité de synthèse d'acide chlorogénique, comme les autres HCT.

2.2.3 Recherche de l'activité de synthèse du 3,5-DCQ par l'HCT d'ipomée

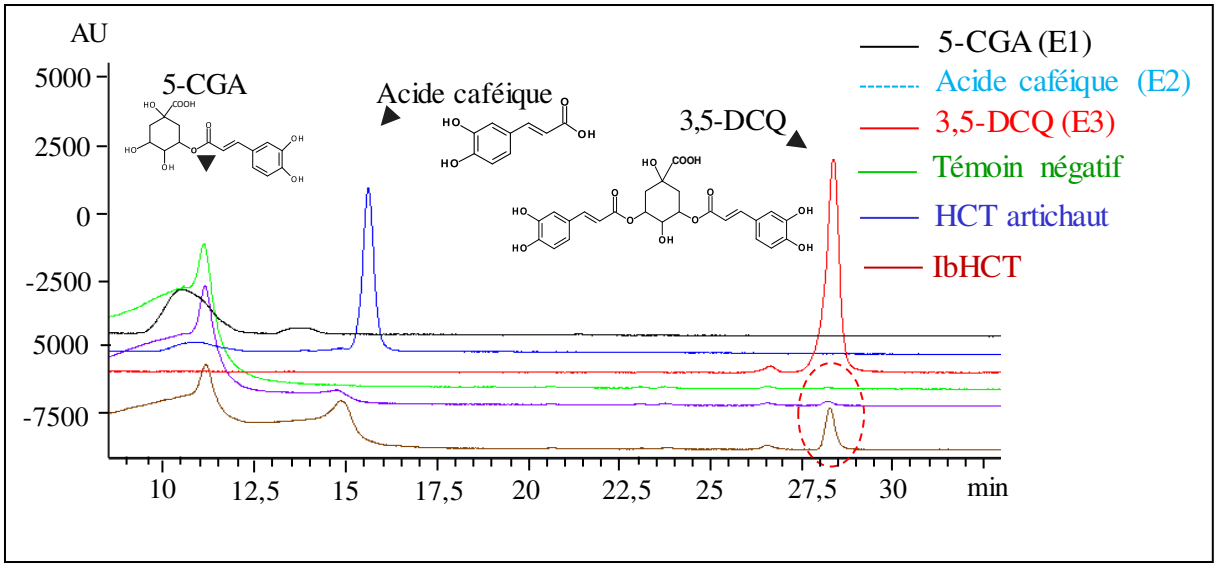


Figure 52 : Synthèse de 3,5-DCQ à partir d'acide chlorogénique dans l'extrait brut contenant l'HCT d'ipomée. A : chromatogramme HPLC. E1, E2, E3 : étalon d'acide chlorogénique (E1 ; ref. C3878, Sigma-Aldrich), acide caféique (E2, ref. C0625, Sigma-Aldrich) et 3,5-DCQ (E3, produit par PAT). 1 : Témoin négatif : extrait brut de bactéries transformées avec le plasmide vide. L'extrait protéique total issu des bactéries exprimant l'HCT d'artichaut est utilisé comme témoin positif.

L'extrait de protéines totales solubles contenant l'HCT d'ipomée a été incubé en présence d'acide chlorogénique. Après 15h d'incubation, on remarque l'apparition d'un pic élué au même temps de rétention que l'étalon de 3,5-DCQ (Figure 52). Nous verrons par la suite l'identification plus détaillée de ce pic par une analyse LC-MS dans le paragraphe δ 2.4.2. La concentration de ce produit étant trop faible pour le détecter en LC-MS, il nous a été nécessaire de passer par des étapes d'optimisation des conditions de synthèse.

2.3 Optimisation des conditions de synthèse des dérivés d'acide caféoyl-quinique

2.3.1 Optimisation des techniques de purification et de concentration de la protéine

Jusque-là nous avons étudié l'activité de l'HCT d'ipomée sur le plan qualitatif. Afin d'étudier spécifiquement l'activité de l'enzyme et d'améliorer les conditions d'incubation, nous avons au préalable mis au point une méthode de purification de la protéine. La protéine est dotée d'une étiquette Hisx6 permettant de la purifier par chromatographie d'affinité (cf δ 5.3.2). Dans ce travail, nous avons utilisé trois systèmes de purification différents :

- 1) Dans les études préliminaires, peu de protéines étaient nécessaires. Nous avons utilisé un système de purification sur colonne spin Ni-NTA (Qiagen) effectué à partir de 630µL d'extrait de protéines totales.
- 2) Dans la seconde partie de ce travail, consistant à multiplier les réactions enzymatiques, il était nécessaire de disposer de quantités de protéines pures plus importantes. Nous avons donc effectué une montée en échelle en utilisant un système de purification sur colonne His-Trap (Healthcare) permettant de purifier jusqu'à 5mL d'extrait brut. La concentration de protéines restait néanmoins insuffisante (9,38mg/mL).
- 3) Pour obtenir plus de protéines au départ, nous avons réalisé une culture bactérienne de 1,4L au lieu de 200mL initial. Après induction à l'IPTG, nous avons lysé les cellules avec une sonde de sonication d'une intensité plus importante (500W/cm^2) que la précédente (200W/cm^2). Après extraction des protéines totales, l'extrait a été purifié sur un système de purification Ni-NTA en Batch (Qiagen) adapté pour des grands volumes allant jusqu'à 15mL d'extrait brut.

Comme présenté dans la Figure 53, les systèmes de purification utilisés ont permis d'isoler la protéine d'intérêt visible sur le gel SDS-Page au poids moléculaire apparent d'environ 50kDa. L'intensité des bandes n'est cependant pas aussi importante que ce l'on peut observer généralement dans la production des protéines recombinantes chez *E. coli* (Peng *et al*., 2013; Sekar *et al*., 2013). Notons que d'autres bandes sont observées à des intensités plus faibles indiquant que certaines protéines n'ont pas été éliminées lors de la purification. Cela s'explique par le fait qu'il y a des fixations aspécifiques de protéines non « his-taggées » sur la colonne qui ne sont pas éliminées pendant les étapes de lavage. Les tampons de lavage n'étaient probablement pas assez concentrés en imidazole pour les décrocher de la colonne.

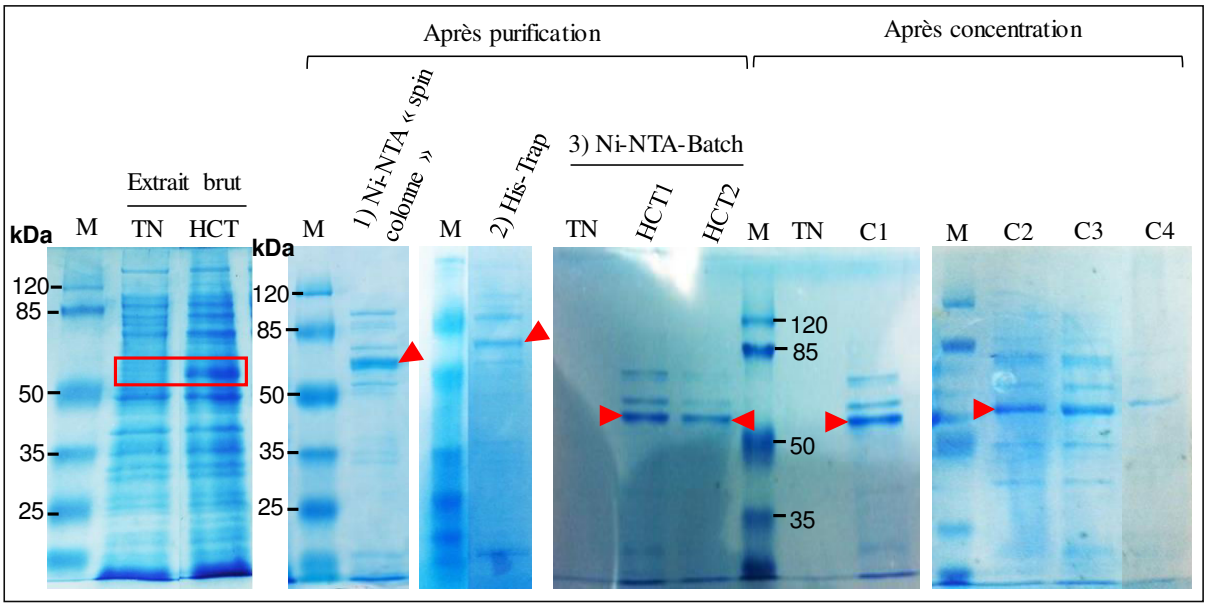


Figure 53 : Séparation des protéines par SDS-PAGE sur les extraits obtenus avec les différents systèmes de purification et de concentration. TN : témoin négatif (extrait issu des bactéries portant le plasmide vide). Les flèches rouges indiquent la protéine IbHCT. HCT1 et HCT2 : éluats collectés après 2 purifications sur colonne Ni-NTA en Batch. C1, C2, C3, C4 : concentrats 1, 2, 3 et 4 récupérés entre les 4 passages de l'extrait dans la colonne Centricon de 10 kDa.

A la dernière étape de purification avec le système Ni-NTA en Batch, la protéine a été éluée 2 fois avec 2,5mL de tampon phosphate de sodium contenant 250mM d'imidazole. La présence de ces sels est susceptible d'altérer l'activité de l'enzyme. Il est donc nécessaire de réaliser un dessalage. La première technique utilisée était une colonne Sephadex, mais la protéine était trop diluée pour être détectée par SDS-Page et son activité enzymatique était perdue. Nous avons donc poursuivi par une étape de concentration en utilisant une colonne Centricon de porosité 10 kDa à travers laquelle les molécules de taille inférieure ne sont pas retenues par la colonne. La porosité supérieure disponible commercialement étant de 30 kDa était adaptée aux protéines de plus de 67 kDa ce qui ne convenait pas à la protéine d'intérêt étant donné son poids de 50 kDa. La colonne Centricon de 10 kDa a été utilisée à la fois pour concentrer la protéine et pour la dessaler. Le volume d'extrait déposé dans la colonne a été réduit de 4 fois après élution. Cette opération a été renouvelée 3 fois en diminuant graduellement la concentration en sels dans le tampon de dilution. Nous avons récupéré les 4 concentrats obtenus après chaque élution.

En analysant chaque concentrat par SDS-PAGE (Figure 53), nous remarquons que la protéine est conservée dans les 3 concentrats (C1, C2, C3), puis elle est perdue dans le 4ème concentrat (C4). Le fait de multiplier les étapes d'élution pour diminuer la concentration en sels peut entraîner une perte de la protéine.

Sur le plan quantitatif, la concentration de l'extrait purifié (36mg/mL) obtenue avec le système Ni-NTA Batch était plus forte que celles obtenues avec les deux autres systèmes (Tableau 32).

Après concentration sur colonne Centricon 10 kDa, le 1er concentrat est presque 2 fois plus concentré que l'extrait de départ, mais les concentrations diminuent dans les concentrats 2 et 3. Le système de concentration est donc efficace si l'on ne réalise qu'une seule étape de concentration, bien que la protéine ne soit pas 4 fois plus concentrée que ce qui était escompté. Cependant, nous devons considérer que l'étape de concentration n'est pas absolue et qu'il y a un risque de perdre de la protéine lors des élutions. Nous avons donc récupéré le 1er concentrat pour réaliser les tests d'incubation.

	Extrait brut	**Extrait purifié**			**Extrait reconcentré et déssalé**
Système de purification		Ni-NTA spin colonne	His-Trap	Ni-NTA Batch	Colonne de 10 kDa
Témoin négatif	280mg/mL	5mg/mL	3,75mg/mL	5mg/mL	7,5mg/mL
IbHCT	308mg/mL	18mg/mL	9,38mg/mL	36mg/mL	Concentrat 1 = 60mg/mL
					Concentrat 2 = 13mg/mL
					Concentrat 3 = 14mg/mL

Tableau 32 : Concentrations des extraits protéiques récupérés sur chaque système de purification et de concentration.

2.3.2 Optimisation des conditions de réaction pour la synthèse de 3,5-DCQ

Après avoir produit et purifié l'enzyme nous en avons initié sa caractérisation fonctionnelle.

2.3.2.1 Détermination du temps d'incubation

Le temps d'incubation est important pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme. Nous avons donc étudié ce paramètre sur la réaction de synthèse de 3,5-DCQ à partir d'acide chlorogénique par l'HCT d'ipomée. Les premiers tests d'incubation ont été réalisés sur une durée d'incubation de 15h. Nous avons donc fait varier ce paramètre à des intervalles de temps plus courts pour suivre l'évolution de la formation du DCQ et de la consommation d'acide chlorogénique. On constate que le 3,5-DCQ est formé dès 1h d'incubation et sa quantité augmente même au bout de 15h d'incubation (Figure 54a). Cette durée d'incubation était suffisante pour détecter correctement en LC-MS le 3,5-DCQ. Cependant ce temps est trop long pour pouvoir déterminer les constantes cinétiques.

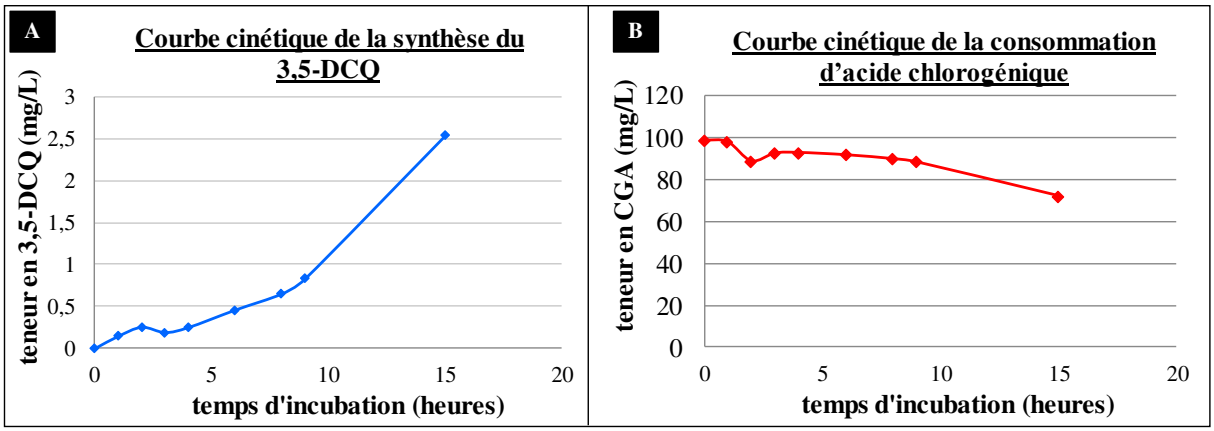


Figure 54 : Etude cinétique de la formation de 3,5-DCQ (A) et de la consommation d'acide chlorogénique en fonction du temps (B).

Pour établir les constantes cinétiques, nous avons choisi de suivre la consommation d'acide chlorogénique au cours du temps (Figure 54b). La courbe cinétique (Figure 54b) indique que la concentration de cette molécule diminue très lentement mais est visible dès 1h d'incubation. Pour la suite de la caractérisation, nous avons choisi d'utiliser cette durée d'incubation pour optimiser les autres paramètres (pH, concentration en enzyme).

2.3.2.2 Effet du pH sur l'activité de l'enzyme

L'activité enzymatique dépend de certains paramètres notamment la température et le pH. Le pH intervient de deux manières : soit en modifiant la structure secondaire ou tertiaire de l'enzyme, soit en modifiant les charges électriques des acides aminés du site actif.

Dans nos conditions réactionnelles, le pH optimal a été déterminé à 6 car la concentration de 3,5-DCQ formé est maximale parmi les 4 pH testés (Figure 55a). Dans la cellule, la vacuole est un compartiment acide et sert de stockage de molécules. On peut supposer que l'enzyme ait une activité de synthèse de DCQ dans la vacuole où l'acide chlorogénique serait stocké, comme il a été clairement démontré sur l'HQT de tomate (Moglia *et al*., 2014). Cette hypothèse peut être vérifiée par une étude de localisation subcellulaire en fusionnant la protéine à une étiquète GFP détectable par son émission fluorescente. A pH6, la quantité d'acide chlorogénique diminue car le CGA est converti en 3,5-DCQ. A pH7 et au-delà, les concentrations en acide chlorogénique et en 3,5-DCQ diminuent considérablement. L'une des raisons qui explique cela est que l'acide chlorogénique est instable à pH basique et en milieu aqueux (Friedman et Jurgens, 2000; Dawidowicz et Typek, 2010). Une autre raison serait que l'enzyme devienne inactive à pH basique. Elle synthétise de l'acide chlorogénique à pH7 (cf δ 2.4.1) mais elle peut perdre son activité à pH8.

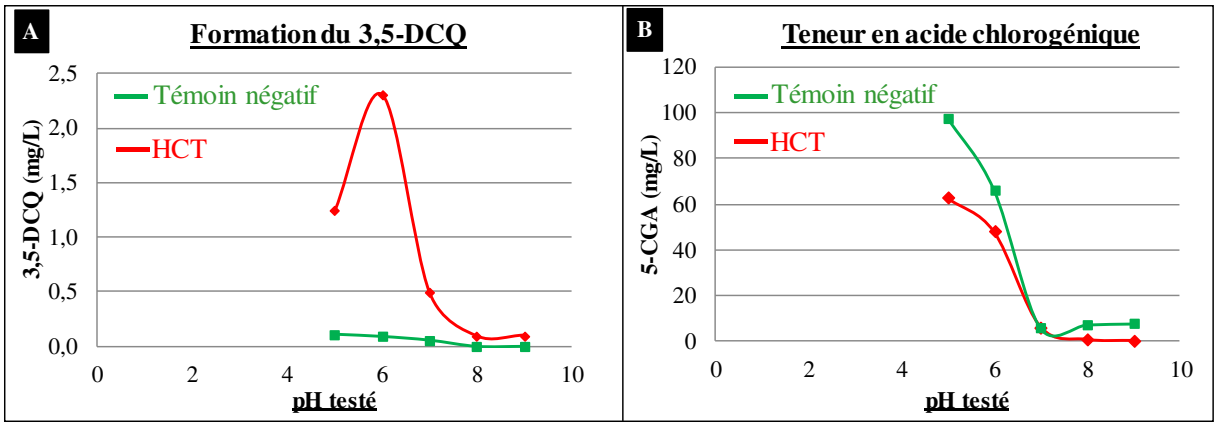


Figure 55 : Effet du pH sur l'activité de synthèse de 3,5-DCQ et de consommation de l'acide chlorogénique par l'HCT d'ipomée. Courbe en vert : témoin négatif ; courbe en rouge : HCT d'ipomée.

2.3.2.3 Effet de la concentration de l'HCT sur la synthèse d'acide chlorogénique

La quantité de produit formé dépend de la quantité d'enzyme présente. Afin d'améliorer l'efficacité de la réaction en une heure d'incubation, nous avons fait varier la concentration de l'enzyme. On observe que la concentration d'acide chlorogénique augmente à mesure qu'on ajoute de l'enzyme puis elle atteint un plateau pour une concentration maximale d'enzyme de 15mg/mL (Figure 56). Ainsi nous avons choisi de travailler à cette concentration pour la suite des tests d'incubation.

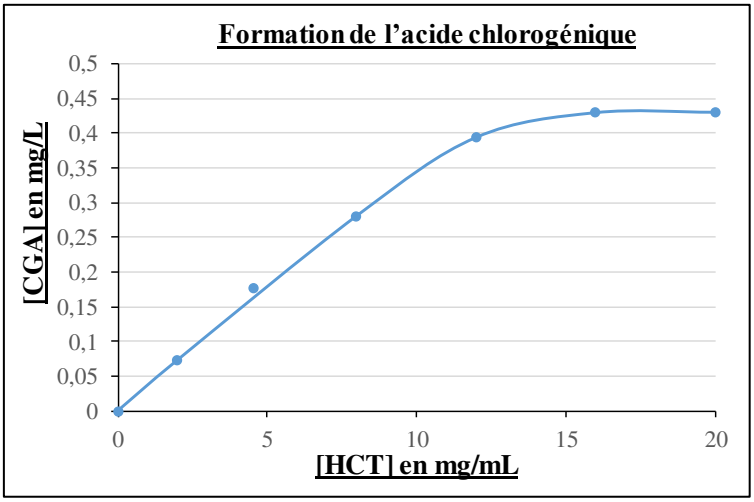


Figure 56 : Détermination de la concentration en protéines pour la synthèse d'acide chlorogénique. Mesure de la concentration en CGA par HPLC après 1h d'incubation à 30°C.

Dans la suite de cette étude, nous avons cherché d'autres fonctions enzymatiques réalisées par l'HCT d'ipomée.

2.4 Identification des produits issus de la réaction avec l'HCT d'ipomée

L'HCT d'ipomée a été incubée en présence de caféoyl-CoA et de quinate pendant 1h à 30°C. A la fin de la réaction, les molécules ont été extraites à l'acétate d'éthyle et analysées en HPLC. Les composés ont été ensuite identifiés par spectrométrie de masse (MS).

2.4.1 Synthèse de l'acide chlorogénique par l'HCT recombinante

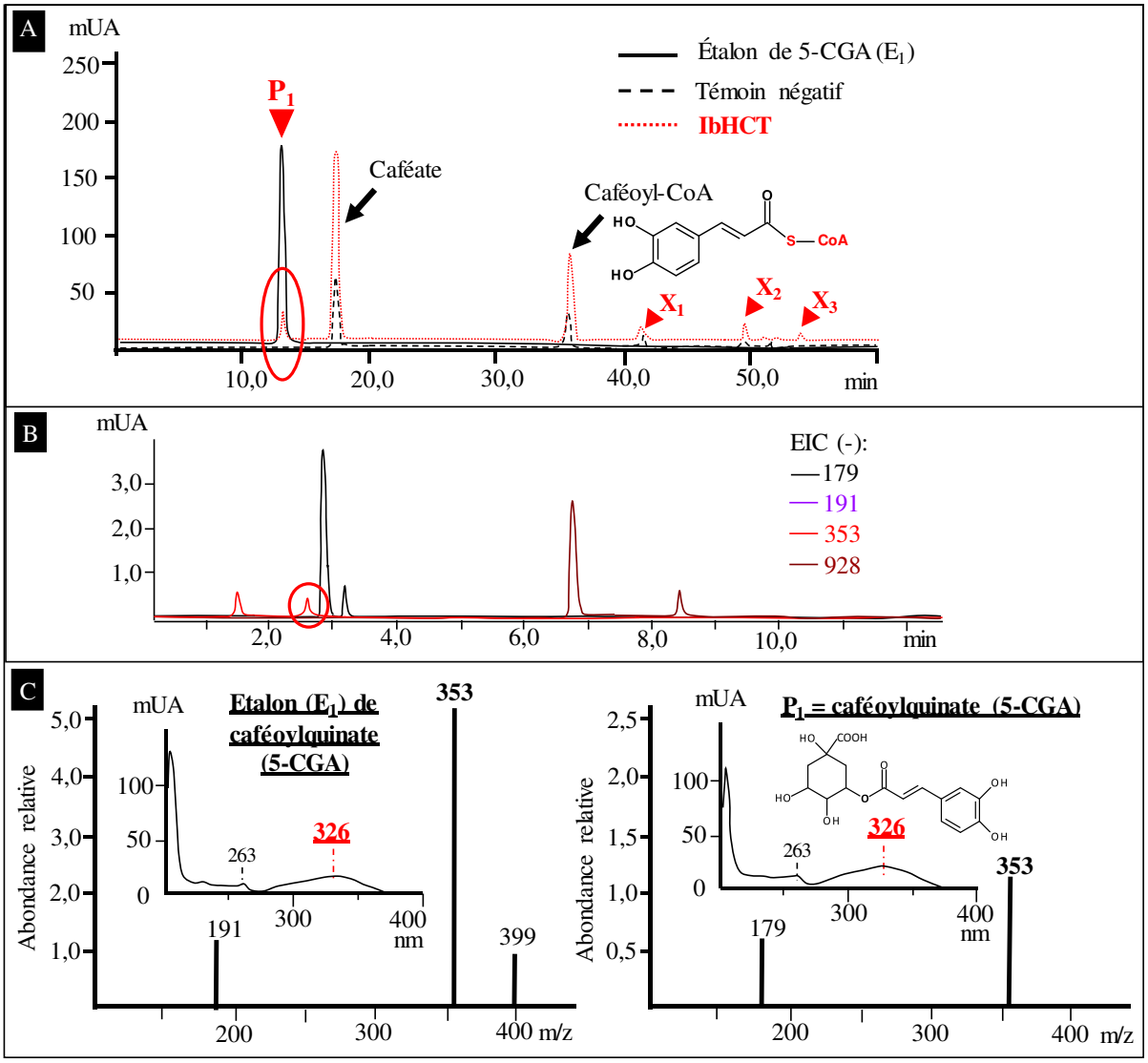


Figure 57 : Synthèse de caféoyl-quinate par l'HCT d'ipomée à partir de caféoyl-CoA et de quinate. A : chromatogramme HPLC à 326nm. B : chromatogramme MS (spectrométrie de masse) en mode négatif aux masses m/z suivantes : 179, 191, 353 et 928. C : spectre MS en mode négatif et spectre UV du produit P1 en comparaison avec les spectres UV et MS de l'étalon (E1) de 5-CGA ; EIC (extracted ion chromatogram). $X_{1,2,3}$: composés non identifiés. P_1 : produit issu de la réaction avec l'HCT.

L'analyse LC-MS basée sur la comparaison du produit P1 et de l'étalon de 5-*O*-caféoylquinate montre des spectres de masse (MS) et spectres UV identiques. Ce produit, qui s'ionise en mode négatif, a une masse m/z de 354 et son absorption maximale est de 326 nm. Le chromatogramme MS en mode négatif est représenté par 2 pics de m/z = 353, correspondant aux deux isomères d'acide chlorogénique : le premier correspond au 3-CGA et le deuxième au 5-CGA (Chanforan *et al*., 2012), car en solution aqueuse, le 5-CGA peut s'isomériser en 3-CGA. Ces résultats confirment que l'HCT synthétise de l'acide chlorogénique. On détecte également de l'acide caféique (m/z = 179) et du caféoyl-CoA (m/z = 929). Cela nous conduit à deux hypothèses : soit l'enzyme catalyse la réaction inverse comme cela est décrit dans la littérature (Hoffmann *et al*., 2003; Comino *et al*., 2007) soit le substrat (le caféoyl-CoA) était en excès. L'acide caféique est produit par hydrolyse de l'acide chlorogénique ou du caféoyl-CoA (Kojima et Kondo, 1985; Lallemand *et al*., 2012).

Le quinate (de masse m/z = 192) n'est pas détecté car il ne s'ionise ni en mode négatif ni en mode positif et n'a pas été non plus détecté en HPLC. Trois autres composés minoritaires (X_1, X_2, X_3), également présents dans le témoin négatif, ne sont pas ionisés en MS et sont probablement des impuretés de la colonne ou des produits de dégradation des molécules.

2.4.2 Synthèse du 3,5-DCQ par l'HCT recombinante à partir d'acide chlorogénique

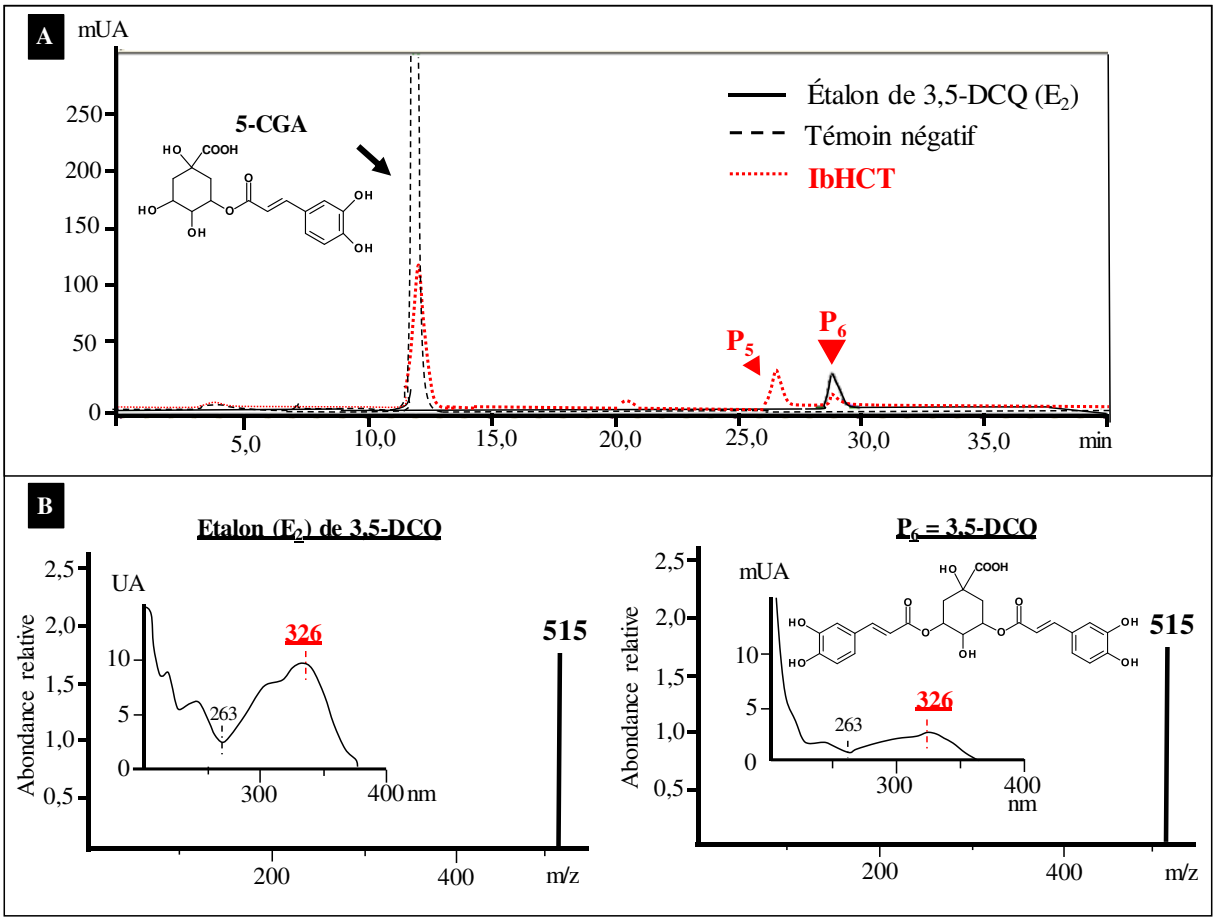


Figure 58 : Synthèse de l'acide 3,5-dicaféoyl-quinique (3,5-DCQ) par l'HCT d'ipomée. A : chromatogramme HPLC à 326nm. B : spectre MS en mode négatif et spectre UV du produit P6 en comparaison avec les spectres UV et MS de l'étalon (E2) de 3,5-DCQ. P5,6 : produits issus de la réaction avec l'HCT.

L'analyse LC-MS a permis de confirmer la présence de 3,5-DCQ d'après les spectres UV et MS identiques entre l'étalon (E_2) et le produit formé (P_6). Le 3,5-DCQ a une masse m/z de 516 et son absorption est maximale à 326nm (Figure 58a et b). L'autre composé (P_5) élué avant le 3,5-DCQ est le 3,4-DCQ résultant de l'isomérisation du 3,5-DCQ (Figure 58a).

La teneur en 3,5-DCQ mesurée à la fin de la réaction était de 2,5mg/L.

Afin de déterminer d'autres fonctions de l'HCT d'ipomée, nous avons testé plusieurs combinaisons de substrats dans les conditions identiques à la synthèse de l'acide chlorogénique.

2.5 Autres fonctions de l'HCT d'ipomée

2.5.1 Synthèse de caféoyl-shikimate

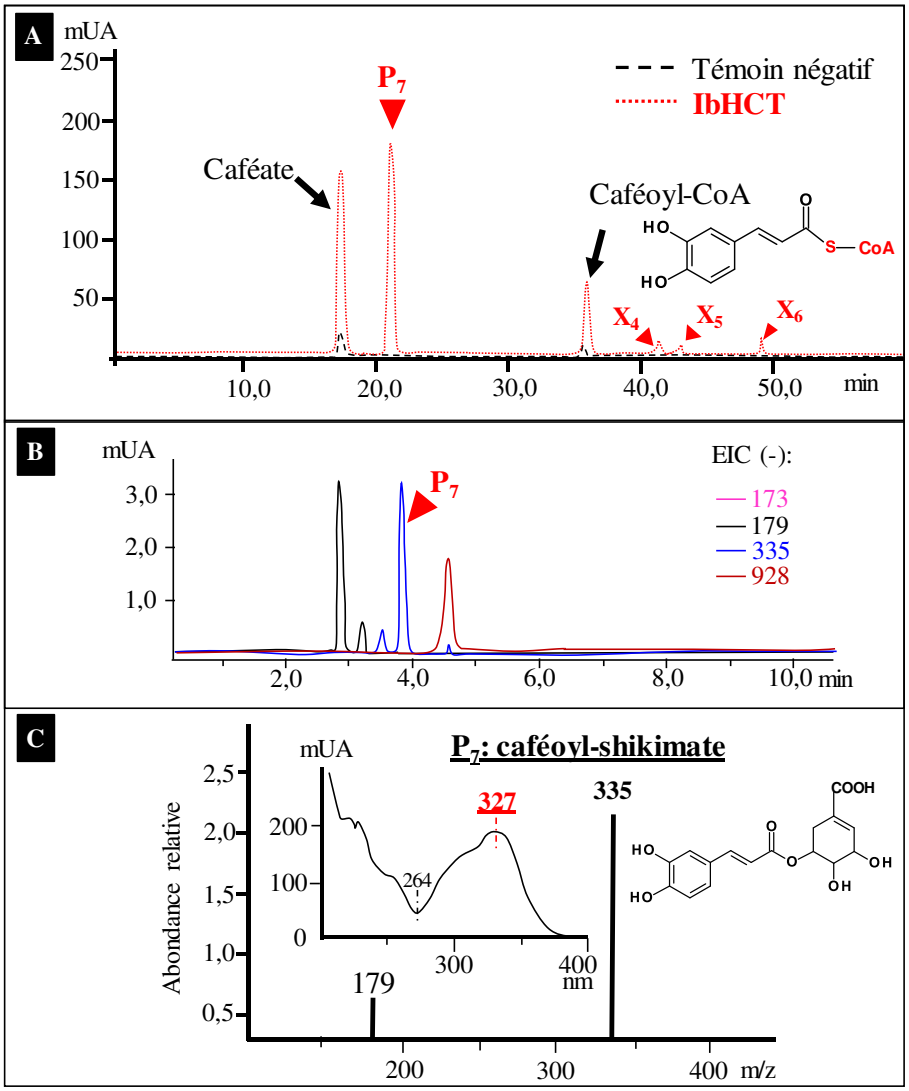


Figure 59 : Synthèse de caféoyl-shikimate par l'HCT d'ipomée à partir de shikimate et de caféoyl-CoA. A : chromatogramme HPLC à 326nm. B : chromatogramme MS en mode négatif. C : spectre MS en mode négatif et spectre UV du produit P7 ; EIC (extracted ion chromatogram). $X_{4,5,6}$: composés non identifiés. P_7 : produit issu de la réaction avec l'HCT.

L'HCT d'ipomée a été incubée en présence de caféoyl-CoA et de shikimate. Après une incubation d'1h à 30°C, le produit formé P_7 présente un spectre UV avec un pic d'absorption à 327nm (Figure 59a et c). Ce composé est caractérisé par une masse m/z de 335 en mode négatif (Figure 59b), correspondant au caféoyl-shikimate (Maier *et al.*, 1964; Jaiswal *et al.*, 2010b, 2011). Deux autres pics mineurs sont détectés à la même masse, qui sont les autres isomères du caféoyl-shikimate (Jaiswal *et al.*, 2011). On détecte également de l'acide caféique (m/z = 179) et du caféoyl-CoA (m/z = 929) (Figure 59b), ce qui rejoint l'observation faite précédemment (δ

2.4.1). Le shikimate (de masse m/z = 174) n'est pas détecté car il ne s'ionise pas avec le système quadripole utilisé.

2.5.2 Synthèse de *p*-coumaroyl-quinate

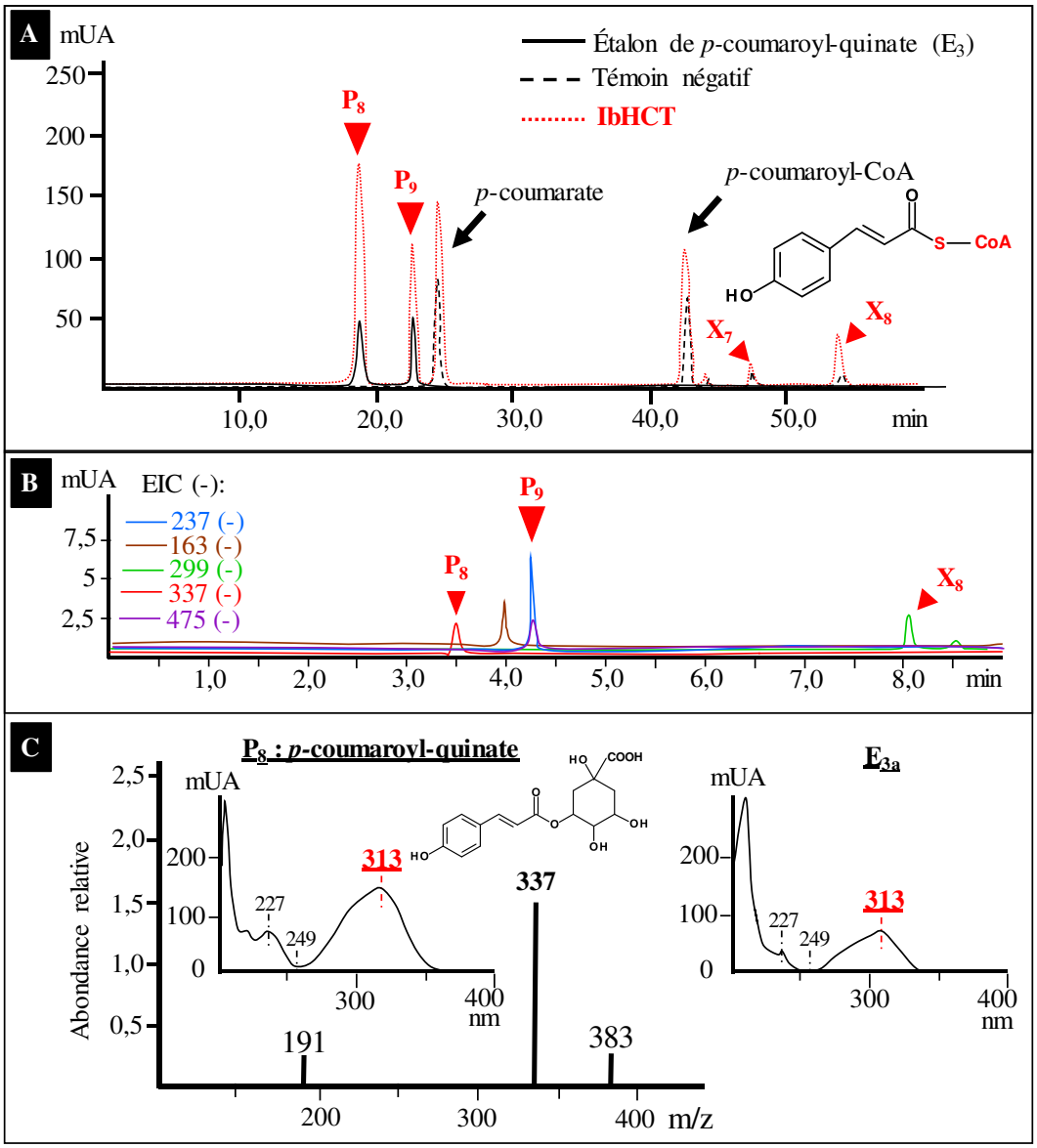


Figure 60 : Synthèse de p-coumaroyl-quinate par l'HCT d'ipomée en présence de p-coumaroyl-CoA et de quinate. A : chromatogramme HPLC à 315nm. B : chromatogramme MS en mode négatif des produits formés. C : spectres MS et UV du produit P_8 et de l'étalon (E_{3a}) de p-coumaroyl-quinate en mode négatif ; EIC (extracted ion chromatogram). $X_{7,8}$: Composés non identifiés. $P_{8,9}$: Produits issus de la réaction avec l'HCT.

L'enzyme a été mise en présence de quinate et de *p*-coumaroyl-CoA. Deux produits sont détectés à 19 et 22 min sur le chromatogramme HPLC (Figure 60a). Le premier produit P_8 montre un spectre UV identique à celui de la solution étalon (E_{3a}) de *p*-coumaroyl-quinate

(Figure 60c). De plus, ce pic a une masse m/z de 337 (en mode négatif) égale à celle du *p*-coumaroyl-quinate (Parveen *et al*., 2011) (Figure 60b). Le *p*-coumarate (m/z : 164) reste présent dans l'extrait ce qui signifie qu'il est en excès ou que l'enzyme catalyse la réaction inverse (Figure 60a).

L'autre produit P_9 n'est pas détecté à la masse m/z de 337, mais il est cependant présent dans l'étalon (E_{3b}) de *p*-coumaroyl-quinate et leurs spectres UV sont identiques (Figure 61). Il s'ionise à deux masses m/z : 237 qui correspond à de l'acide quinique greffé à de l'acide formique et la masse 475 correspond à 2 quinates. Le *p*-coumaroyl-quinate existe sous forme de 3 isomères (Jaiswal *et al*., 2010b), il s'agit donc d'un de ces 3 isomères qui a été totalement fragmenté en MS. Pour distinguer ces isomères, les composés doivent être identifiés à des masses plus précises avec des analyses plus poussées (Orbitrap ou QQ-Tof par exemple).

Deux autres composés (X_7 et X_8) sont détectés dans le témoin négatif et l'extrait enzymatique, dont l'un s'ionise à une masse de 299 (Figure 60a et b). Cette masse n'est cependant pas assez précise pour identifier cette molécule en simple quadripole. Ces composés sont probablement issus de modifications des molécules (oxydation, isomérisation, estérification).

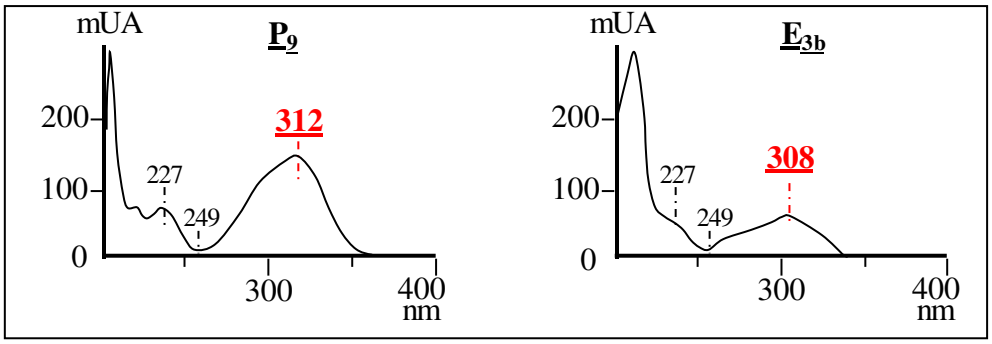


Figure 61 : Spectres UV du produit P9 et comparaison avec celui de l'étalon de coumaroyl-quinate. P_9 : produit issu de la réaction. E3b : solution étalon de p-coumaroyl-quinate.

2.5.3 Synthèse de *p*-coumaroyl-shikimate

L'incubation de l'HCT en présence de *p*-coumaroyl-CoA et de shikimate conduit à la formation de 3 produits (P_{10}, P_{11}, P_{12}) (Figure 62a). Ces composés ont tous la même masse m/z de 319, ce qui correspond à la masse du *p*-coumaroyl-shikimate (Figure 62b et c) (Kim *et al*., 2013). Ces composés correspondent aux 3 isomères de *p*-coumaroyl-shikimate (3-, 4- et 5-*O*-CS), dont les spectres UV sont également très similaires (Figure 63). Les pics m/z minoritaires à 355 et 365 correspondent respectivement à des adduits de potassium et d'acide formique (Figure 63). Le rôle de l'HCT dans cette voie de biosynthèse a déjà été décrit chez d'autres espèces (Hoffmann *et al*., 2003; Sullivan, 2009). Le *p*-coumarate et le *p*-coumaroyl-CoA sont encore détectés, donc soit la réaction n'a pas été totale, soit au bout d'une heure la réaction s'est inversée pour

redonner du *p*-coumaroyl-CoA et du shikimate. Trois autres produits inconnus (X_9, X_{10}, X_{11}) sont détectés en HPLC (Figure 62a) mais pas en MS, pouvant être des impuretés ou des produits de dégradation des molécules. L'identification de ces composés ne peut se faire qu'en MS^2.

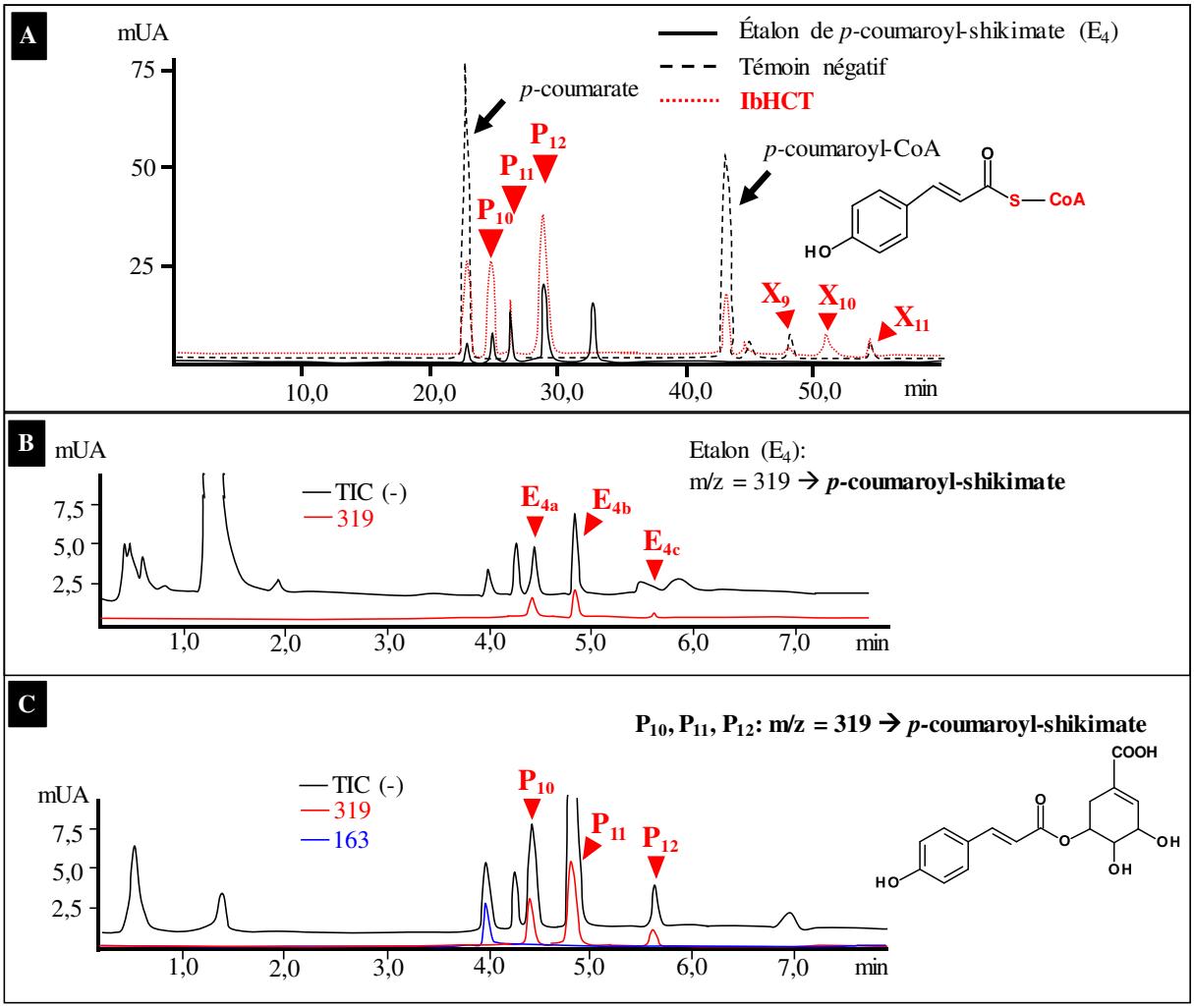


Figure 62 : Synthèse de p-coumaroyl-shikimate par l'HCT d'ipomée à partir de p-coumaroyl-CoA et de shikimate. A : chromatogramme HPLC à 310nm. B : chromatogramme MS en mode négatif de l'étalon (E_4) de p-coumaroyl-shikimate. C : spectre MS en mode négatif des produits P10, P11 et P12. TIC : total ion chromatogram. $X_{9,10,11}$: Composés non identifiés. P : produits issus de la réaction avec l'HCT.

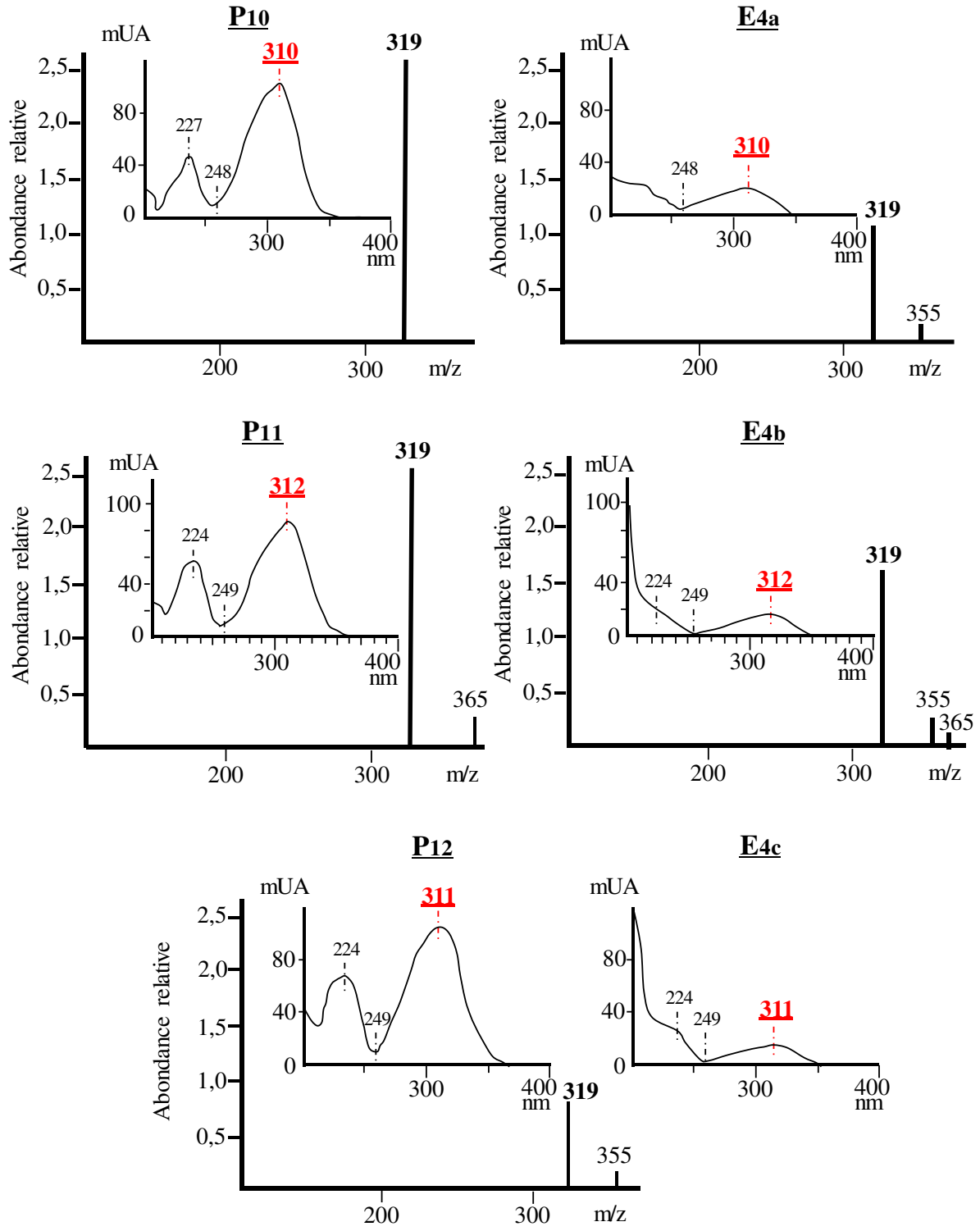


Figure 63 : Spectres MS et UV des produits formés par l'HCT après incubation en présence de p-coumaroyl-CoA et de shikimate en comparaison avec les spectres MS et UV de l'étalon (E_{4a}, E_{4b}, E_{4c}) de p-coumaroyl-shikimate. P : produit issu de la réaction avec l'HCT.

2.5.4 Synthèse de cinnamoyl-quinate

Nous avons testé la réaction entre le cinnamoyl-CoA et le quinate en présence de l'HCT. A la fin de la réaction, on note l'apparition d'un nouveau composé (Figure 64a). Ce produit (P13) montre une absorption maximale dans les UV à 280nm (Figure 64c). Sa masse m/z est de 322, ce qui correspond à la masse théorique du cinnamoyl-quinate (Figure 64b et c). A ma connaissance, peu de données dans la littérature ont porté sur la caractérisation de ce composé. Le cinnamate (m/z = 148) présent dans l'extrait, est détecté en HPLC mais ne s'ionise pas en MS.

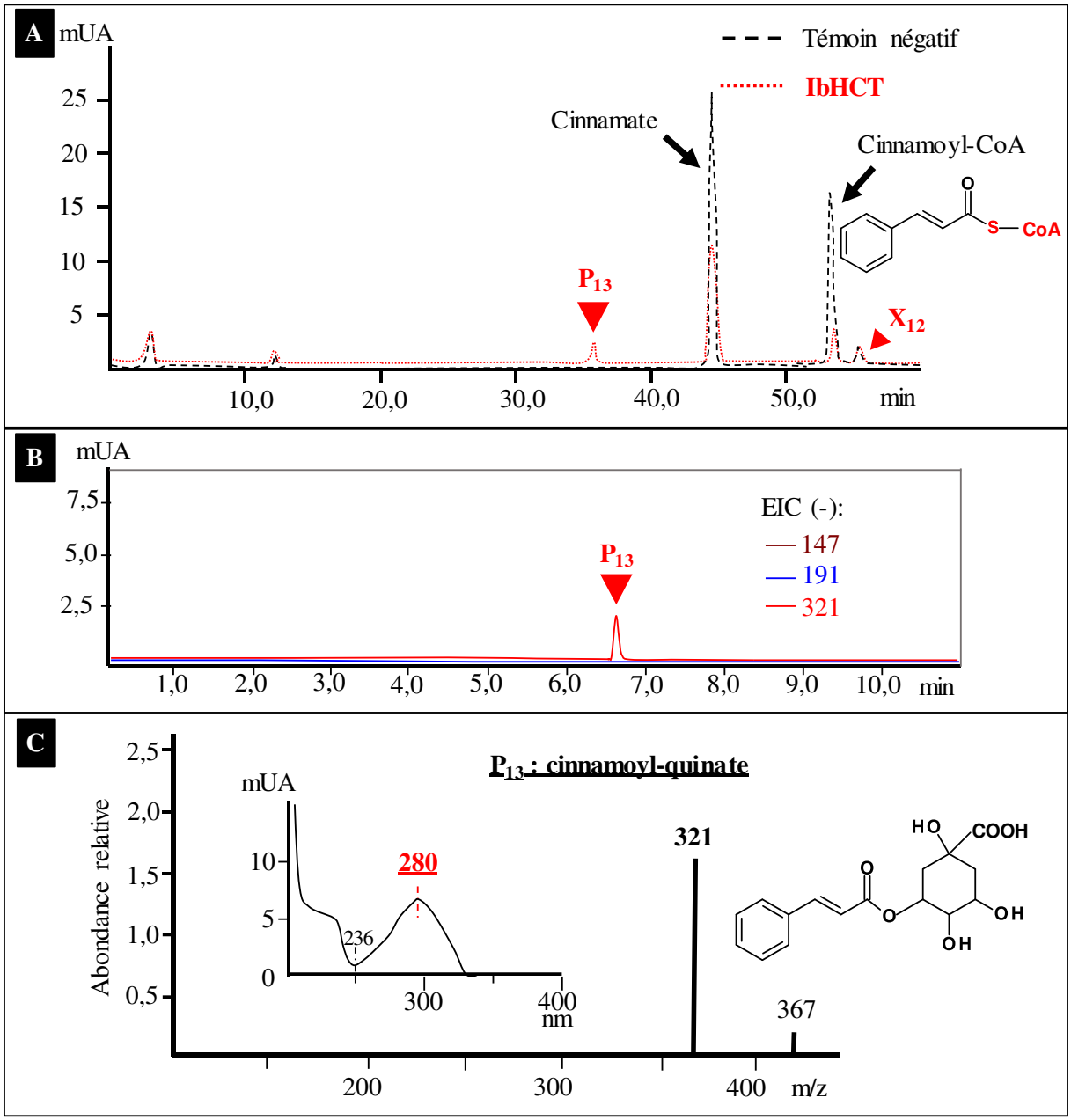


Figure 64 : Synthèse de cinnamoyl-quinate par l'HCT d'ipomée à partir de cinnamoyl-CoA et de quinate. A : chromatogramme HPLC à 310nm. B : chromatogramme MS en mode négatif

aux masses m/z suivantes : 147, 191 et 321. C : spectre MS en mode négatif et spectre UV du produit P13 ; EIC (extracted ion chromatogram). X_{12} : composé non identifié. P : produit issu de la réaction avec l'HCT.

On remarque que le pic de cinnamoyl-quinate est très léger par rapport à l'acide cinnamique et le pic de cinnamoyl-CoA est beaucoup plus petit que celui du témoin négatif. Etant donné que la concentration de cinnamoyl-CoA synthétisé était très faible, cela peut expliquer pourquoi le pic de cinnamoyl-quinate est très petit. Les HCTs ne jouent pas un rôle majeur dans cette voie de biosynthèse, mais ce composé semble être plutôt formé sous l'action d'une lipase (Armesto *et al*., 2003). Un autre composé inconnu (X_{12}) est élué après le cinnamoyl-CoA (Figure 64) mais sa masse n'a pas pu être déterminée en MS.

2.5.5 Synthèse de cinnamoyl-shikimate

Afin de voir si l'HCT est capable de former du cinnamoyl-shikimate à partir de cinnamoyl-CoA et de quinate, nous avons incubé l'enzyme en présence de ces substrats. Le produit P_{14} détecté dans l'extrait d'HCT (Figure 65a) est en fait subdivisé en plusieurs pics (Figure 65b) d'après le chromatogramme MS, ce qui indique qu'il y a eu une co-élution de plusieurs composés qui ont la même masse m/z (Figure 65a et b). D'après son spectre UV, son absorption est maximale à 277nm (Figure 65c). Les données bibliographiques sont minces concernant la caractérisation du cinnamoyl-shikimate. Sa masse m/z de 303 correspond à la masse théorique du cinnamoyl-shikimate. Un autre pic de même intensité à m/z de 349 correspond à un adduit d'acide acétique avec ce composé qui s'est probablement formé après la réaction (Figure 65c).

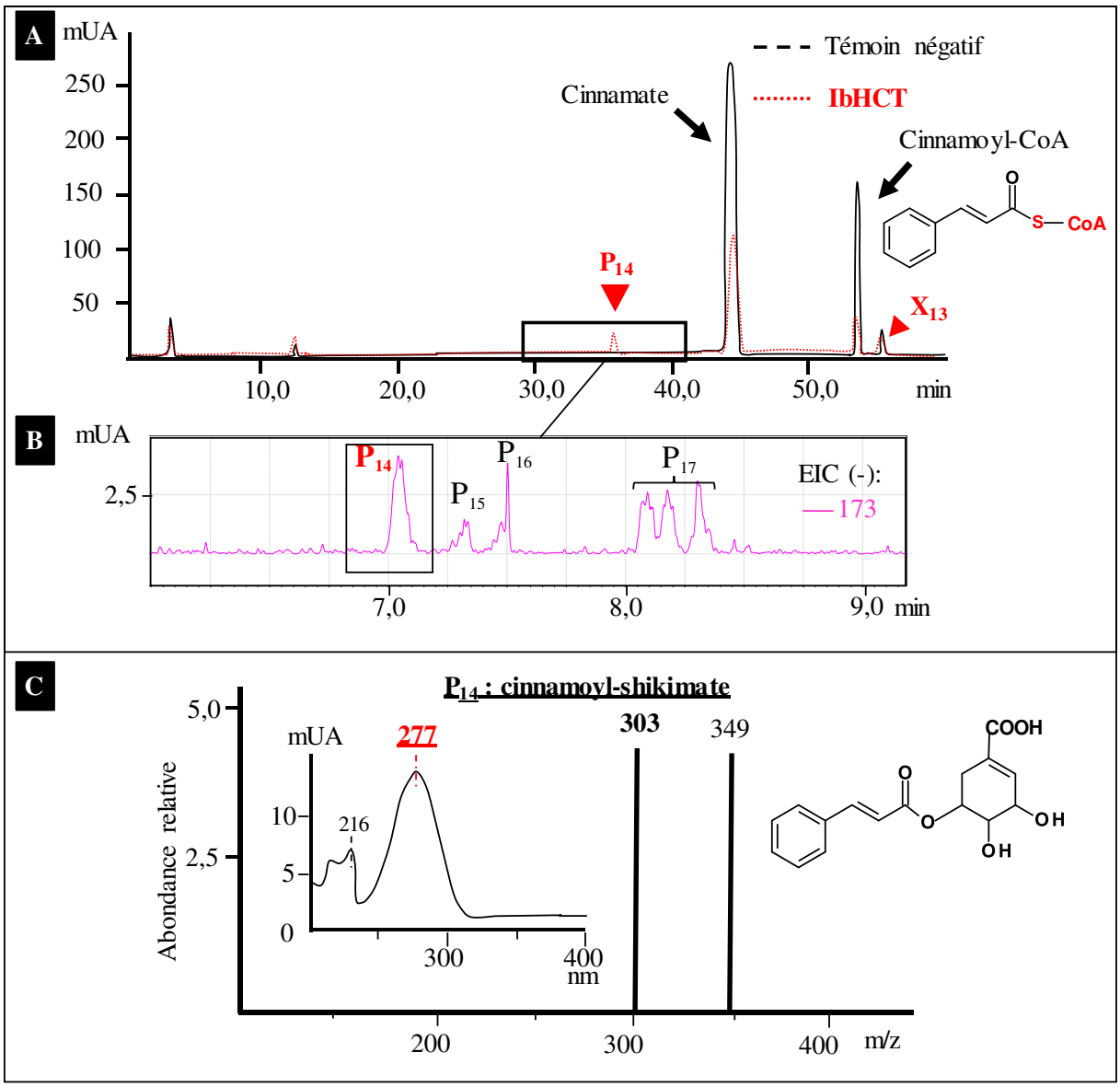


Figure 65 : Synthèse de cinnamoyl-shikimate par l'HCT d'ipomée en présence de cinnamoyl-CoA et de shikimate. A : chromatogramme HPLC à 310nm. B : chromatogramme MS en mode

négatif du produit P_{14} extrait à la masse m/z de 308. C : spectre MS en mode négatif et spectre UV du produit P_{14} ; EIC (extracted ion chromatogram). X_{13} : composé non identifié. P : produit issu de la réaction avec l'HCT.

2.6 Conclusion relative à la caractérisation fonctionnelle de l'HCT d'ipomée

Dans cette deuxième partie, nous avons abordé la caractérisation fonctionnelle d'une des enzymes candidates identifiée chez la patate douce. Cette caractérisation fonctionnelle s'est déroulée en deux étapes. La première a consisté à produire les différents substrats de la réaction en quantité suffisante et la seconde étape nous a amené à utiliser ces différents substrats dans le cadre d'un criblage métabolique *in vitro*. L'amélioration du protocole de production des esters de CoA nous a permis de générer des rendements substantiellement plus importants que ceux décrits dans la littérature (0,1-0,2mM). Cette première étape était nécessaire pour réaliser la caractérisation fonctionnelle de l'enzyme, expérimentation nécessitant une grande quantité de substrats. Cependant ces molécules sont fragiles du fait d'une hydrolyse des liaisons thiolesters, ce qui les rend difficilement conservables. Il est donc nécessaire de produire ces molécules dans un délai très court avant les tests d'incubation enzymatique. La qualité de ces substrats a été vérifiée par HPLC et les esters de CoA ont été identifiés par comparaison de leur spectre UV avec celui des molécules authentiques trouvées dans le commerce. Le substrat synthétisé le plus efficacement est le *p*-coumaroyl-CoA (85% de rendement de synthèse), vient ensuite le caféoyl-CoA (75%), le féruloyl-CoA (65%) et enfin le cinnamoyl-CoA (15%). Ces différences de rendement s'expliquent par le fait que la 4CL1 de tabac utilise préférentiellement le *p*-coumarate comme substrat comme le font la plupart des 4CL, mais la spécificité du substrat dépend aussi de l'isoforme ainsi que de l'espèce végétale d'origine (Lee et Douglas, 1996; Costa *et al*., 2005; Sun *et al*., 2013). Il serait donc intéressant de tester d'autres 4CL provenant d'autres plantes, comme celle d'*Ipomoea batatas* dont la séquence codante est disponible sur GenBank (ID N°AB469557) et dans la banque de RNAseq ou alors de muter certains acides aminés pour changer la spécificité de l'enzyme pour d'autres substrats.

Dans un second temps, nous avons tenté de produire certaines protéines recombinantes chez *E. coli*. Dans le cas de la protéine codée par le gène *Ib9*, cette approche s'est avérée infructueuse. Il est possible que le problème rencontré soit lié à la maturation de la protéine ou alors aux conditions d'induction de l'expression (Gopal et Kumar, 2013; Correa et Oppezzo, 2015) ou des erreurs dans la séquence codante. Pour aller plus loin, il sera nécessaire, à présent, d'envisager d'autres conditions expérimentales voire d'autres systèmes de production. Ainsi, ces protéines pourraient être exprimées dans *N. tabacum* qui est un système particulièrement efficace pour la production de protéines recombinantes. Les avantages de ce système sont que les substrats sont déjà présents dans la plante et que la machinerie cellulaire dispose des modifications post-traductionnelles propres aux eucaryotes (glycosylations, acétylations, méthylations etc…). La limite est qu'il existe déjà des transférases dans le tabac. Si l'on reste dans le système bactérien, il faudra envisager de jouer sur les conditions expérimentales. Des

systèmes alternatifs ont été décrits pour augmenter le niveau d'expression des protéines recombinantes. L'une des stratégies consiste à coexprimer la protéine d'intérêt avec des chaperones moléculaires qui aident à la bonne conformation de la protéine et permettent d'améliorer la solubilité de la protéine. Les chaperones cytoplasmiques les plus courantes sont le facteur Trigger, les protéines DnaK, ou DnaJ ou le complexe GroES-GroEL (Nishihara *et al*., 1998). Il existe un autre moyen pour augmenter la solubilité de la protéine en la fusionnant à des étiquettes non peptidiques qui agissent comme des « enhancers » (Smith et Johnson, 1988; Kapust et Waugh, 1999). L'utilisation de l'étiquette Fh8 (8-kDa calcium binding protein) s'est avérée récemment prometteuse (Costa *et al*., 2013). On peut également optimiser les paramètres de culture comme changer la composition du milieu (température, ajout d'osmolytes, de peptones, de sucres, etc…) ou l'oxygénation (de Marco *et al*., 2005). Récemment, un nouveau concept d'auto-induction a été développé en ajoutant dans le milieu un mélange de glucose, de lactose et de glycérol. Le rôle de ces sucres permet de contrôler la densité cellulaire et l'induction de l'expression dans le temps, ce qui dispense l'ajout d'inducteur (Studier, 2014). D'autres options permettant de contrôler le niveau d'expression des protéines reposent sur le choix du plasmide, du type de promoteur et de la souche hôte (Rosano et Ceccarelli, 2014). Une autre stratégie serait d'optimiser les codons dans la séquence d'intérêt ou d'utiliser une souche hôte modifiée afin de faciliter l'utilisation des codons rares par les ARN-t de l'hôte (Rosano et Ceccarelli, 2009; Welch *et al*., 2009).

Dans le cas de l'HCT, la production de protéine a été possible, même si les rendements de production se sont avérés être assez moyens. La présence d'estérases dans les extraits bactériens qui entrainaient la dégradation des substrats nous a amené à purifier la protéine en utilisant plusieurs approches possibles. Etant donné les rendements assez faibles de protéines, un de nos objectifs était de produire en quantité suffisante pour réaliser l'ensemble de nos tests. Sur les différents systèmes de purification testés, c'est la technique Ni-NTA en Batch couplée à une concentration sur colonne de 10 kDa qui a permis d'obtenir l'extrait pur le plus concentré (60mg/mL).

Finalement le criblage métabolique nous a permis de générer un certain nombre de produits (Tableau 33). Les esters d'acides hydroxycinnamiques ont été produits après 1h d'incubation à 30°C. L'identification des substrats et des produits a été confirmée par comparaison des spectres UV et par spectrométrie de masse.

Substrats	quinate	shikimate	5-CGA	**Produits formés**
Caféoyl-coA	+	+		Caféoyl-quinate et -shikimate
Coumaroyl-coA	+	+		Coumaroyl-quinate et -shikimate
Cinnamoyl-coA	+	+		Cinnamoyl-quinate et -shikimate
Féruloyl-coA	-	-		aucun
CoA			+	3,5-DCQ

Tableau 33 : Bilan de la synthèse des composés produits par l'HCT d'ipomée recombinante.

Ainsi nous avons observé que l'HCT d'ipomée est capable d'utiliser tous les esters de CoA testés comme substrats sauf le féruloyl-CoA. Des résultats similaires observés sur les HCT de café et de tabac (tests réalisés en parallèle) indiquent que ces enzymes sont relativement peu spécifiques pour ces différents substrats (Hoffmann *et al*., 2003; Lallemand *et al*., 2012). Vu le nombre de gènes orthologues identifiés dans le cadre de ce travail, on pourrait alors imaginer que ces gènes (ou certains d'entre eux) aient une origine évolutive commune. Ces différents gènes pourraient avoir divergé par des phénomènes de duplication et/ou de mutations à partir d'un gène ancestral conduisant à des néo-fonctionnalisations (Ober, 2005, 2010), comme c'est souvent le cas dans les différentes classes d'acyltransférases de la famille des BAHD (St-Pierre et De Luca, 2000).

Pour évaluer cette hypothèse nous avons élargi notre criblage métabolique pour tenter d'identifier une éventuelle spécialisation de l'HCT d'ipomée pour la synthèse de certaines molécules peut-être plus spécifiques à l'ipomée. Nous avons ainsi montré que l'HCT est capable de synthétiser du 3,5-DCQ à partir d'acide chlorogénique. Cette activité a déjà été démontrée pour une HCT de café (Lallemand *et al*., 2012). Notons que la synthèse du 3,5-DCQ par l'enzyme étudiée n'a lieu qu'à pH6, alors que la synthèse d'acide chlorogénique se produit à pH7. Cela peut s'expliquer par le fait que l'activité de l'enzyme peut changer selon le compartiment cellulaire. Il est donc probable que l'activité de synthèse de 3,5-DCQ se fasse dans un compartiment acide de la cellule comme la vacuole. Pour clarifier cette localisation subcellulaire, il aurait été intéressant de créer une protéine fusionnée à une GFP et de l'exprimer dans le tabac. Nous avons également observé que la durée de réaction pour synthétiser du 3,5-DCQ est très longue (au moins 15h) ce qui va dans le sens des résultats décrits par Lallemand *et al* sur l'HCT de café (Lallemand *et al*., 2012). Cette synthèse mène à la production de très faibles quantités de 3,5-DCQ difficilement quantifiable. Pour cette raison, il n'a pas été possible de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme (Km, Vm). Le Km de l'HCT de café est de 757µM pour l'acide chlorogénique alors qu'il est de 75µM pour le shikimate et 430µM pour le quinate, ce qui signifie que l'enzyme ne prend pas en priorité l'acide chlorogénique pour synthétiser du 3,5-DCQ (Lallemand *et al*., 2012). D'après un certain nombre d'études

(Hoffmann *et al*., 2003; Niggeweg *et al*., 2004; Comino *et al*., 2007), les HCT effectuent le plus souvent des réactions réversibles. Il est de fait possible que les faibles rendements de réaction soient liés à un équilibre entre le précurseur et le produit. Pour vérifier si l'enzyme catalyse simultanément la réaction inverse, il faudrait incuber l'enzyme avec les produits, en l'occurence le 3,5-DCQ et le caféoyl-CoA, et voir si cela conduit à la formation d'acide chlorogénique. Si tel était le cas, il faudrait envisager l'inhibition de la réaction « réverse ». Pour empêcher le phénomène de réversibilité, il a été montré que certains inhibiteurs pouvaient avoir une influence sur l'activité de l'enzyme (Lotfy, 1995). Une autre solution serait de changer le pH de la réaction pour déplacer la réaction dans le sens désiré, ou encore modifier certains résidus dans la séquence peptidique de l'enzyme par mutagénèse dirigée (Labrou *et al*., 2016). Dans la cellule ou dans la plante, cette réversibilité pourrait être contrecarrée si l'on pouvait exporter le 3,5-DCQ dans un compartiment où il serait non transformé en activant des transporteurs. On pourrait également envisager de changer la localisation subcellulaire de l'enzyme en lui rajoutant un peptide signal qui induirait, selon le pH, son activité de synthèse du 3,5-DCQ. A noter que chez la tomate, l'activité de synthèse du 3,5-DCQ semble être portée par une HQT, dont la localisation a été détectée dans le cytoplasme ou dans la vacuole (Moglia *et al*., 2014). La présence d'un peptide signal n'a pas été jusque-là mise en évidence. L'existence d'une même activité de synthèse de DCQ, effectuée par deux enzymes appartenant à des familles différentes, suggère une évolution convergente chez différentes familles de plantes conduisant à des voies alternatives. Certaines HCT jouent un rôle important dans la synthèse de lignine (Wagner *et al*., 2007), l'une des fonctions principales chez les plantes primitives (Molgaard et Ravn, 1988). Les diverses spécificités de substrats des HCT chez différentes espèces ont débouché sur de nouvelles fonctions enzymatiques pour former de nouveaux métabolites secondaires (Hoffmann *et al*., 2003; Sander et Petersen, 2011; Lallemand *et al*., 2012). Il peut s'agir d'un processus adaptatif que les plantes ont développé au cours de l'évolution. La synthèse des dérivés d'acide caféoyl-quinique a pu servir à d'autres buts, notamment dans la protection de la plante contre les pathogènes et les herbivores (Matern et Kneusel, 1988; Niggeweg *et al*., 2004).

D'après l'analyse phylogénétique, les acyltransférases de la famille des BAHD ont hérité de spécificités de substrat différentes au cours de l'évolution, qu'il est cependant difficile de prédire par simple analyse bioinformatique (Luo *et al*., 2007). Des études structurales couplées à des approches de mutagénèse et d'analyse biochimique pourraient permettre d'élucider les sites actifs spécifiques de cette famille multifonctionnelle.

Bien souvent on utilise des vecteurs d'expression pour produire les protéines recombinantes avec des étiquettes de fusion. L'inconvénient de ce système est que cette extension dans la séquence protéique peut induire un changement de conformation de la protéine et altérer son activité. Comme le soulignent Lallemand et ses collaborateurs, certains résidus situés dans la région consensus HXXXD ou dans la région DFGWG sont indispensables à l'activité de l'enzyme pour la synthèse de 3,5-DCQ (Lallemand *et al*., 2012). Il existe cependant des méthodes permettant d'exciser ces séquences avec des protéases. Dans notre cas, la protéine a

été fusionnée à une étiquette His^6 aux extrémités N- et C-terminales qui peut être éliminée par un traitement avec de la thrombine.

Ainsi, nous avons démontré que **l'HCT d'ipomée est capable de synthétiser de l'acide chlorogénique, du 3,5-DCQ et d'autres esters d'acides hydroxycinnamiques *in vitro***. Afin de confirmer son activité *in vivo*, nous avons créé des plantes transgéniques produisant l'HCT d'ipomée.

3 Chapitre 3 : étude de l'activité de synthèse du 3,5-DCQ par l'HCT *in planta*

3.1 Création de plantes transgéniques par transformation *via Agrobacterium tumefaciens*

En vue d'étudier la fonction du gène codant l'HCT d'ipomée dans la plante, nous avons généré des tabacs transgéniques par transformation *via Agrobacterium tumefaciens*. Les Agrobactéries ont été préalablement transformées avec un plasmide binaire (pGWB2-GW) cloné avec le gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Trois constructions plasmidiques ont été générées :

- La construction $pGWB_2$-*IbHCT* contenant le gène codant l'HCT d'ipomée. Pour obtenir la construction plasmidique pGWB2-*IbHCT*, le fragment *IbHCT* a été cloné dans le pCR8 et après avoir vérifié l'exactitude de la séquence et le sens de l'insert, il a été intégré dans le pGWB2-GW.

- La construction $pGWB_2$-*HCT* de café (*CcHCT*). La protéine codée par ce gène a été caractérisée *in vitro* pour son activité de synthèse de 3,5-DCQ à partir d'acide chlorogénique par Lallemand et ses collaborateurs en 2012. Nous l'avons donc étudié afin de comparer ce gène avec celui de l'HCT d'ipomée. Le gène *HCT* de café (*Coffea canephora,* accession NCBI EF137954) a été directement cloné dans le pCR8 par GenScript. Ce gène a été ensuite cloné dans le pGWB2-GW par LR recombinaison.

- La construction $pGWB_2$-*pNep2*. Cette construction a été réalisée afin d'utiliser un témoin négatif pour l'étude des HCT. La séquence a été clonée dans le plasmide pCR8 par Dr Sissi Miguel. Le gène a été ensuite intégré dans le pGWB2-GW par LR recombinaison, ce qui constituera le témoin négatif.

L'insertion du transgène dans le plasmide a été vérifiée par PCR. Le fragment a été amplifié en utilisant l'amorce P35S Dir qui s'hybride en amont du site ATG du transgène et l'amorce

reverse qui s'hybride à l'extrémité 3' du gène d'intérêt. Pour la construction pGWB2-*pNep2*, on observe un fragment d'environ 700pb correspondant à *pNep2* de 666pb (Figure 66a). Pour la construction pGWB2-*CcHCT*, l'amplicon mesure environ 1600pb car le gène *CcHCT* fait 1336pb et le promoteur 35S est à 300pb du début de la séquence d'intérêt (Figure 66b). Idem pour la construction pGWB2-*IbHCT*, le poids moléculaire apparent de l'amplicon est de 1600pb qui est la somme du gène *IbHCT* (1296pb) et du P35S (300pb) (Figure 66c).

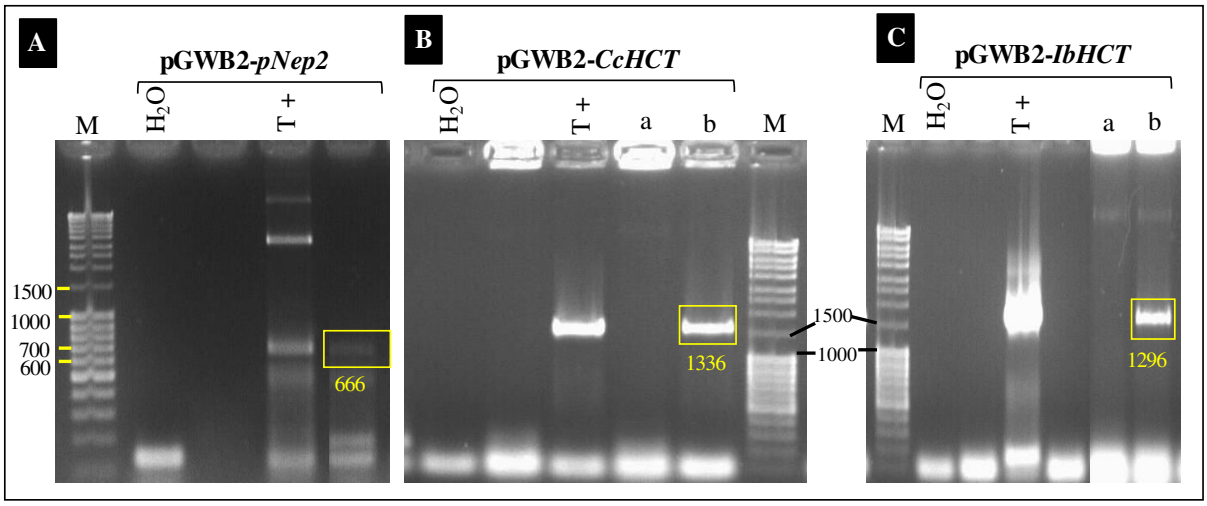


Figure 66 : Vérification de l'insertion du gène d'intérêt dans le plasmide pGWB2-GW. PCR menée sur le plasmide recombiné. A : amplification avec les amorces Dir et Rev du gène pNep2 (666pb). B : vérification du sens d'insertion de CcHCT dans le pGWB2-GW. C : vérification du sens d'insertion de IbHCT dans le pGWB2-GW. (a) amplification de l'insert avec l'amorce P35S Dir et l'amorce Rev du gène d'intérêt (si insertion dans le bon sens) ; (b) : amplification avec les amorces P35S Dir et l'amorce Dir du gène (si insertion dans le mauvais sens). T + : pCR8-gène d'intérêt. H_2O : amplification menée sur l'eau afin de vérifier l'absence de contamination.

Ces plasmides ont été ensuite introduits dans la souche d'*A. tumefaciens* LBA4404 (pAL4404) afin de débuter la transformation génétique du tabac. Pour chaque construction, les bactéries transformées ont été sélectionnées sur un milieu additionné de kanamycine, de rifampicine et de streptomycine et l'insertion du plasmide dans les bactéries a été vérifiée par digestion enzymatique (cf. δ 4.5.5). Le plasmide pGWB2-GW possède deux sites de restriction *Eco*RI situés de part et d'autre de la cassette *ccdB* à 6286pb et 9754 pb (Figure 67a). On peut donc vérifier l'insertion du transgène par digestion avec cette enzyme. Le plasmide non recombiné a une taille de 17236pb et contient la cassette *ccdB* d'une longueur de 1749pb. Après digestion, deux coupures ont eu lieu ce qui a généré un grand fragment (17236 – 3468 = 13768 pb) et un fragment plus court (9754 - 6286 + 1749 = 5217pb) (Figure 67). Dans le cas du plasmide recombiné, la cassette *ccdB* est remplacée par le gène d'intérêt, il en résulte 3 fragments digérés : le grand fragment (13768pb), le court fragment sans la cassette *ccdB* (9754 – 6286 = 3468pb) et le fragment d'intérêt (*pNep2* : 666pb ; *IbHCT* :1296pb) (Figure 67b et c). Le gène

CcHCT (de 1336pb) est un cas particulier car il possède dans sa séquence un site de coupure *Eco*RI ce qui a généré deux fragments au lieu d'un (1000 et 336pb) (Figure 67c).

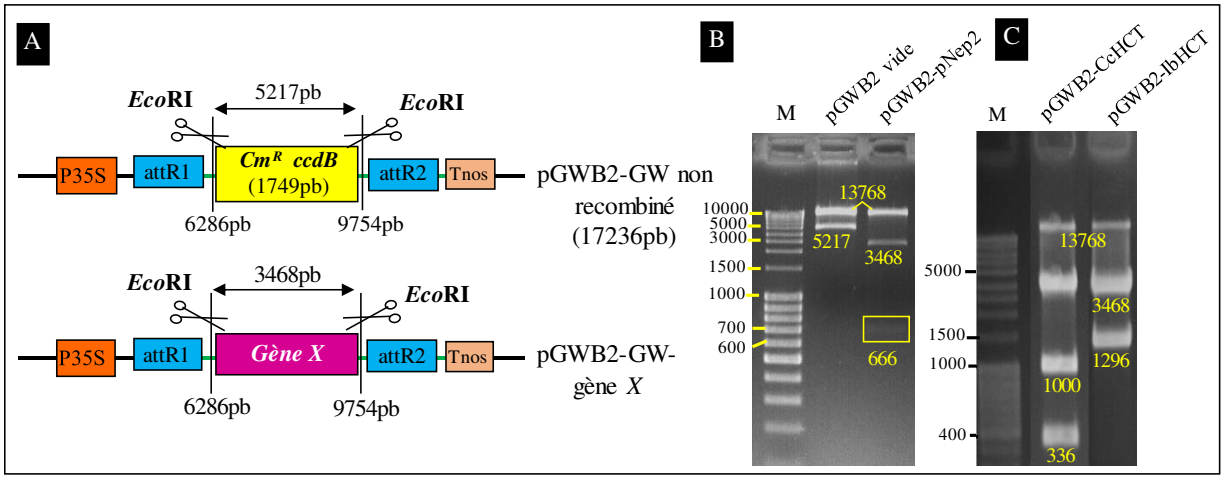


Figure 67 : Vérification de l'intégration du plasmide recombiné dans les Agrobactéries transformées. A : schéma simplifié de la cassette où est inséré le gène d'intérêt (X) dans le pGWB2-GW. B : digestion enzymatique avec EcoRI du plasmide pGWB2-GW non recombiné (vide) et des constructions plasmidiques pGWB2-pNEp2, (C) pGWB2-CcHCT et pGWB2-IbHCT.

Ces bactéries ont été utilisées pour infecter des explants foliaires de *vitro* plants de tabac. Après co-culture (Figure 68a), les segments foliaires ont été transférés sur un milieu de sélection (Figure 68b) contenant de la céfotaxime afin d'éliminer les Agrobactéries et en présence d'hygromycine pour sélectionner les plantes ayant reçu le gène d'intérêt. Au bout de deux semaines, des parties aériennes régénérantes sont apparues (Figure 68b).

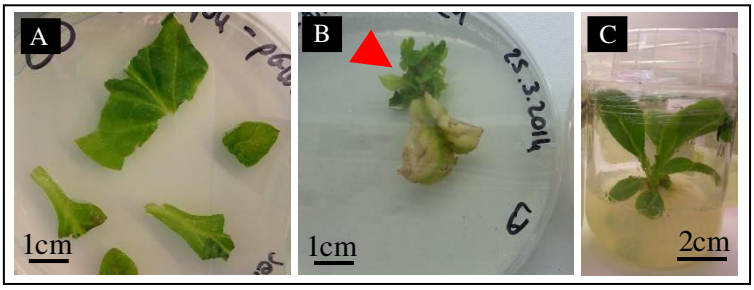


Figure 68 : Etapes de la transformation génétique de vitro plants de tabac via Agrobacterium tumefaciens. A : transfert des explants foliaires sur un milieu de coculture avec les Agrobactéries. B : transfert des explants sur un milieu de sélection en présence de céfotaxime et d'hygromycine. C : régénération d'une plante entière sur milieu sélectif additionné d'hormones de croissance (6-BAP et NAA).

Ces jeunes pousses ont été ensuite transférées sur un milieu contenant les hormones de croissance (6-BAP et NAA) nécessaires à la régénération d'une plante entière (Figure 68c) tout en maintenant la pression de sélection.

3.2 Criblage moléculaire des plantes par réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Après une première sélection sur un milieu contenant un antibiotique, nous avons réalisé un criblage moléculaire afin de sélectionner les plantes ayant inséré dans leur génome le gène d'intérêt. Pour cela, 7 plantules issues d'événements de transformation différents ont été analysées par PCR à partir de l'ADN génomique de jeunes feuilles.

Pour les plantes transformées avec le gène *pNep2*, nous observons une bande autour de 350pb qui correspond à la taille théorique du gène amplifié (352pb) (Figure 69a). Cette bande est retrouvée dans le témoin positif (pCR8-*pNep2*) mais pas dans le témoin « eau » donc l'amplification est bien spécifique. Dans la suite de ce travail, nous nommerons ces plantes transgéniques « contrôle ».

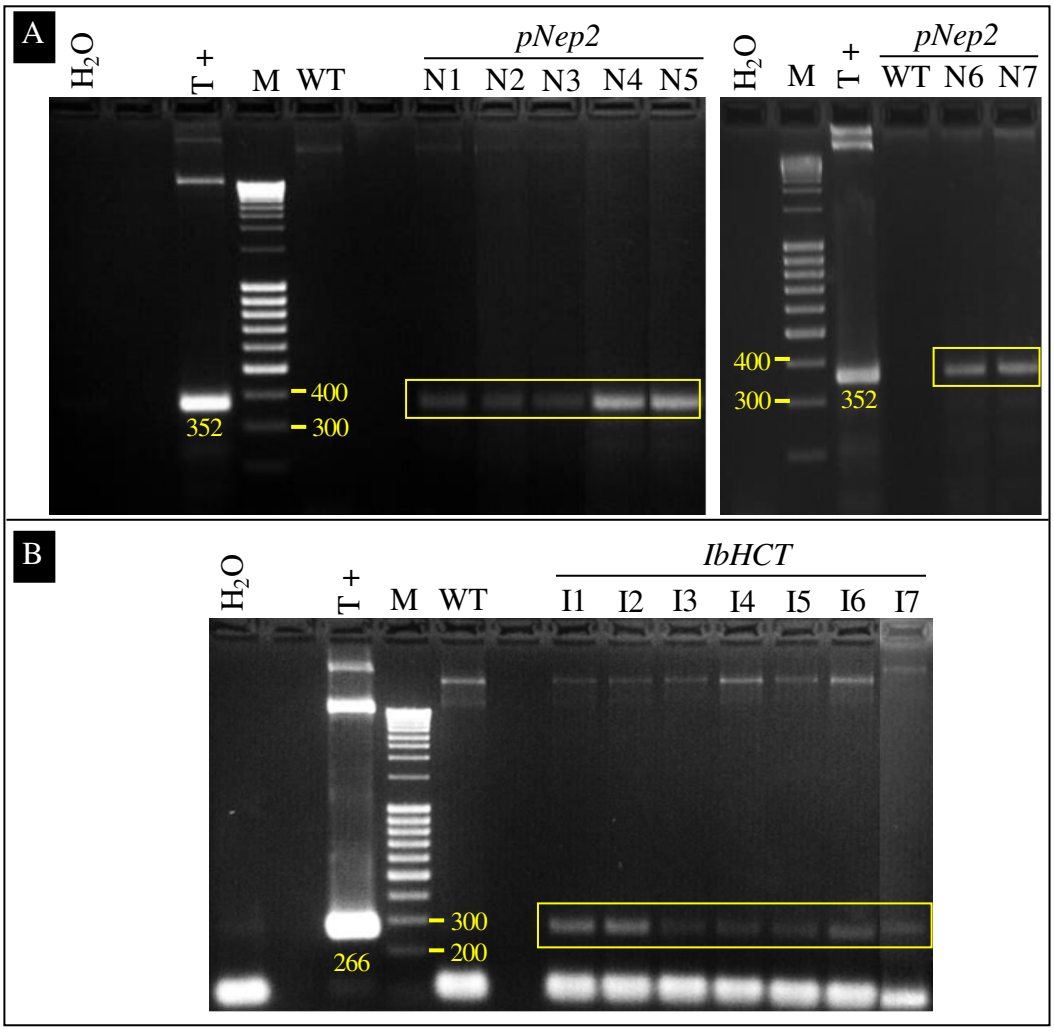


Figure 69 : Sélection des plantes transformées par PCR. A : amplification du gène pNep2 (352 pb). B : amplification du gène IbHCT (266 pb). WT : plante sauvage (non transformée). T + : gène d'intérêt cloné dans un plasmide.

Pour les plantes transformées avec le gène *IbHCT*, la présence du gène est visualisée par une bande en dessous de 300pb dont la taille théorique est de 266pb (Figure 69b) comme le montre le témoin positif.

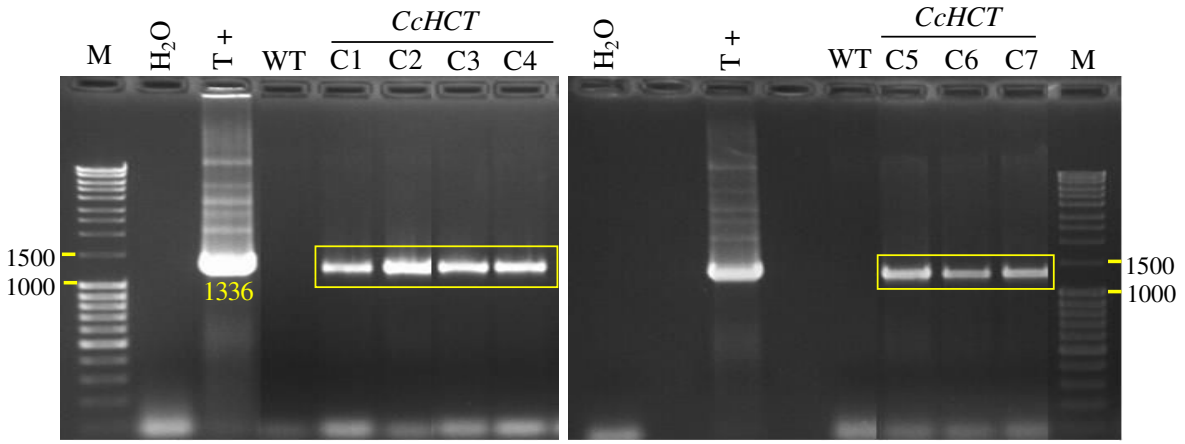


Figure 70 : Sélection des plantes transformées par PCR. Amplification du gène CcHCT (1336 pb). WT : plante sauvage (non transformée).

Pour les plantes transformées avec le gène *CcHCT*, la présence d'une bande en-dessous de 1500pb, telle qu'elle est montrée dans le témoin positif (pCR8-*CcHCT*), indique la présence du gène dont la taille théorique est de 1336pb (Figure 70).

Dans la plante sauvage, aucune bande d'amplification correspondant à ces gènes n'est détectée (Figure 69a et b, Figure 70), ce qui signifie que le gène n'est pas présent dans la plante non transformée et qu'aucun gène endogène n'est amplifié avec les amorces utilisées.

En nous basant sur ces résultats, nous avons sélectionné 7 plantes transgéniques pour chacune des constructions portant le gène d'intérêt dans leur génome. Ces plantes sont issues d'événements de transformation indépendants.

Afin de vérifier si les gènes sont bien exprimés dans la plante, nous avons réalisé des analyses de qPCR sur chaque plante.

3.3 Etude corrélative entre l'expression du gène et la production des métabolites cibles

3.3.1 Niveaux d'expression relative du transgène dans les plantes transformées

Le gène d'intérêt a été placé sous le contrôle du promoteur P35S qui est un promoteur constitutif permettant l'expression du transgène dans toute la plante. Mais la transformation *via Agrobacterium* conduit à une insertion aléatoire dans le génome végétal. Selon la région où le gène est inséré, celui-ci sera plus ou moins exprimé. L'évaluation du niveau d'expression du transgène a été réalisée pour 7 lignées transgéniques contenant chaque gène d'intérêt. Comme le montre la Figure 71, l'expression des gènes *IbHCT* et *CcHCT* est détectée dans les plantes transgéniques à des niveaux variables pour chaque plante, correspondant à des évènements de transformation différents. Ainsi, ces analyses de qPCR ont permis de vérifier l'expression du transgène dans les plantes régénérées. L'expression du gène *CcHCT* dans la plante N°6 est très faible (Figure 71b), il est possible que le gène se soit éteint au stade de développement de la feuille prélevée. La plante sauvage et les plantes « témoin négatif » n'expriment pas le gène cible, ce qui signifie que les amorces sont bien spécifiques du gène d'intérêt.

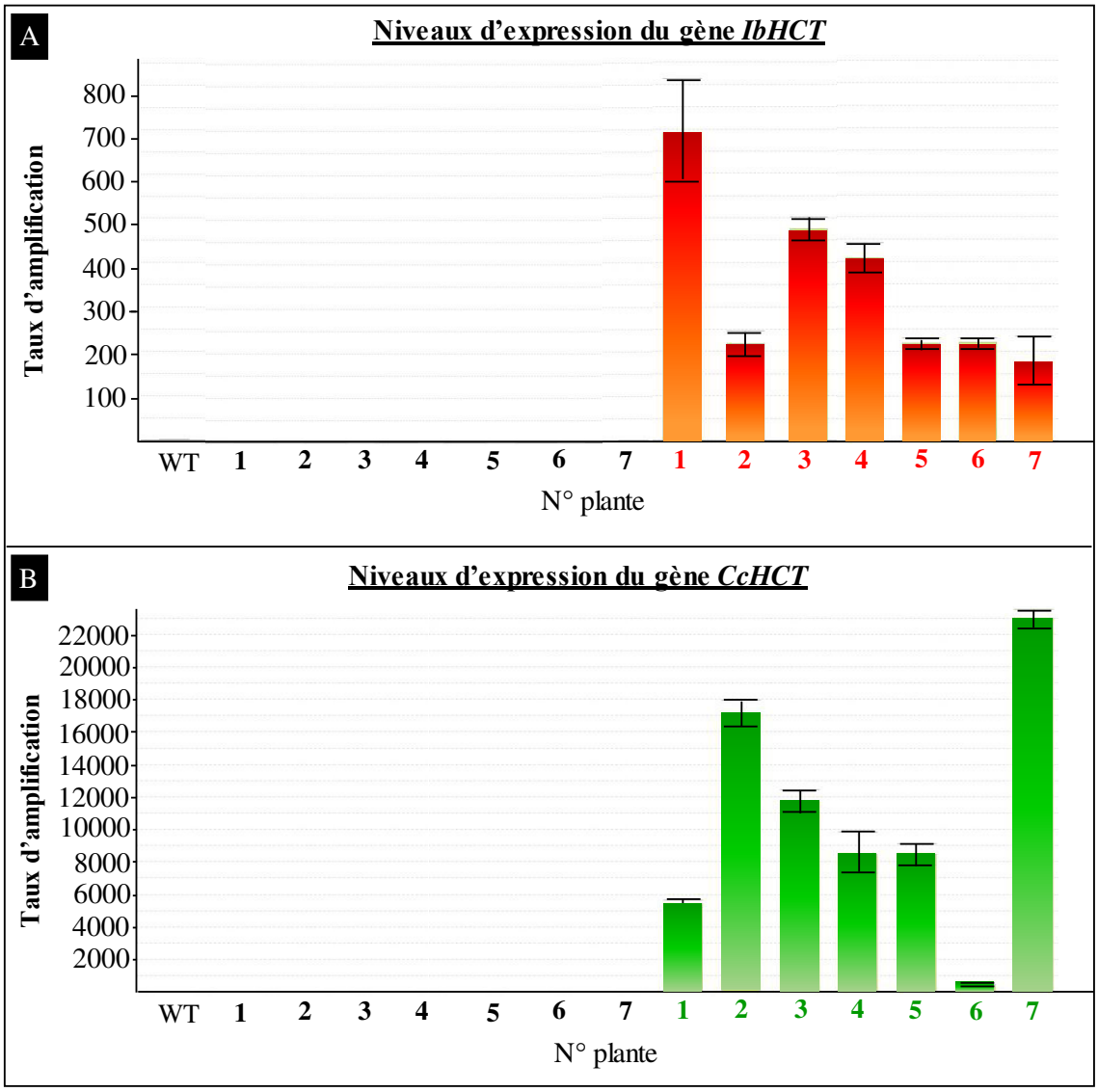


Figure 71 : Niveaux d'expression relative du gène d'intérêt (HCT) dans les tabacs transgéniques. Plantes 1 → 7 (noir) : plantes « contrôle » (plantes transgéniques dépourvues du gène d'intérêt) ; Plantes 1 → 7 (rouge) : plantes transformées avec le gène IbHCT. Plantes 1 → 7 (vert) : plantes transformées avec le gène CcHCT.

L'introduction d'un gène d'intérêt dans un système hétérologue donne plusieurs avantages, comme une augmentation de la concentration en enzymes cibles et de leur produits (Jørgensen *et al*., 2005). Si le gène codant pour l'HCT est fortement exprimé, on peut s'attendre à ce que la production de DCQ soit simultanément augmentée. Pour voir s'il y a une corrélation entre l'expression des gènes et la synthèse de 3,5-DCQ et d'acide chlorogénique, nous avons mesuré la teneur en 3,5-DCQ sur ces mêmes plantes.

3.3.2 Comparaison des teneurs en 3,5-DCQ et en acide chlorogénique sur les plantes transgéniques

A partir des mêmes tissus utilisés pour l'analyse de qPCR, nous avons réalisé des extraits hydro-éthanoliques pour analyser les métabolites par HPLC. Les Figure 72 et Figure 73 indiquent les teneurs en acide chlorogénique et en 3,5-DCQ dans les feuilles prélevées des 7 plantes préalablement sélectionnées par l'analyse transcriptomique.

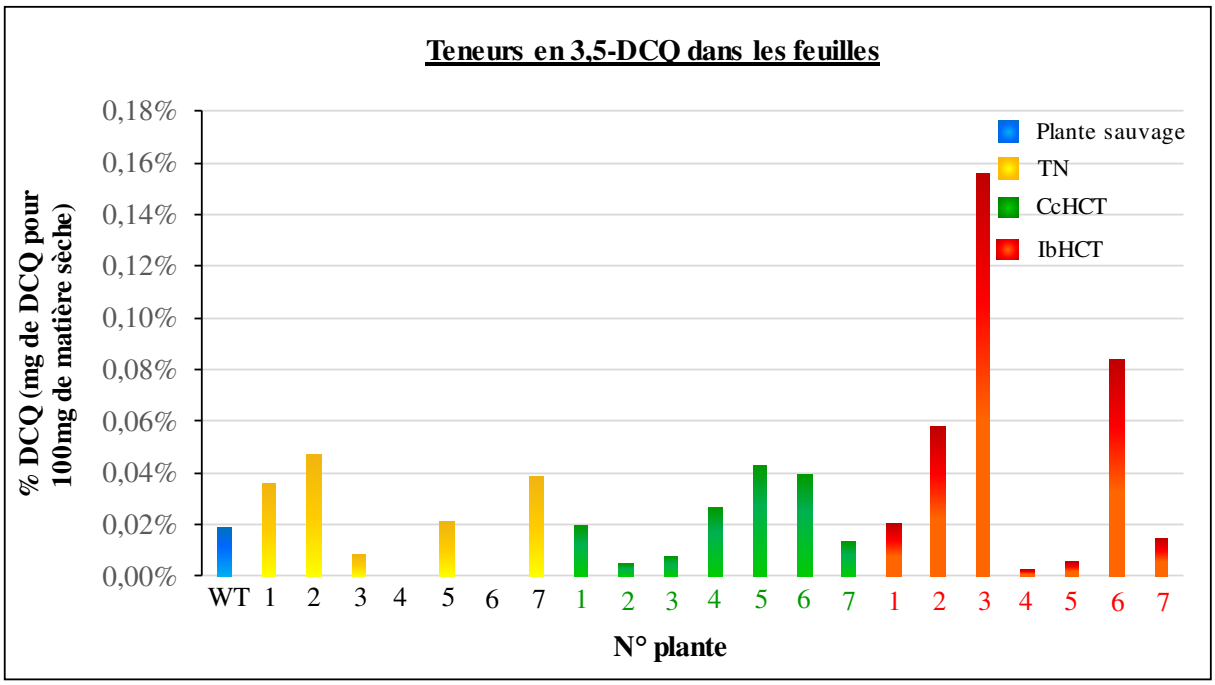


Figure 72 : Teneurs en 3,5-DCQ dans les feuilles de tabac. TN : Témoin négatif (plantes transformées avec le gène pNep2 utilisé comme contrôle) ; CcHCT : plantes transformées avec le gène CcHCT ; IbHCT : Plantes transformées avec le gène IbHCT.

On remarque que les teneurs en 3,5-DCQ et en acide chlorogénique sont très variables entre les différentes plantes transgéniques, y compris entre les plantes transformées avec le même gène (Figure 72 et Figure 73). La quantité de métabolites peut être régulée par la mise en place de mécanismes liés au catabolisme et à la néosynthèse (Matsuda *et al.*, 2003b), ce qui peut expliquer ces variations. En outre, nous n'observons pas de différences entre les plantes transformées avec les HCT, les plantes « contrôle » et la plante sauvage. Contrairement à ce qui était attendu, nous n'observons pas de corrélation entre l'expression du gène d'intérêt et la synthèse des métabolites cibles. Mais cela ne signifie pas pour autant qu'il n'y ait pas d'augmentation de la synthèse des métabolites cibles. Certaines publications stipulent que l'expression des gènes peut être conditionnée par l'accumulation des molécules (Jiang *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016). Autrement dit le gène peut s'exprimer au moment de la phase de synthèse des molécules puis s'éteindre à la phase d'accumulation, ce qui permet de réguler le taux de molécules.

Pour expliquer qu'il n'y ait pas d'augmentation de teneur en métabolites cibles dans les plantes exprimant les HCT, l'autre hypothèse serait que l'enzyme soit en condition de substrat limitant. L'acide chlorogénique endogène n'est peut-être pas suffisant pour être remobilisé vers la synthèse de 3,5-DCQ (Moglia *et al.*, 2014). Des expériences de radiomarquage pourraient renseigner sur le devenir de ces molécules dans la plante. L'âge de la feuille est aussi un facteur à prendre en compte car il a été rapporté que la teneur en acide chlorogénique diminue dans les feuilles plus âgées (Morales *et al.*, 2005).

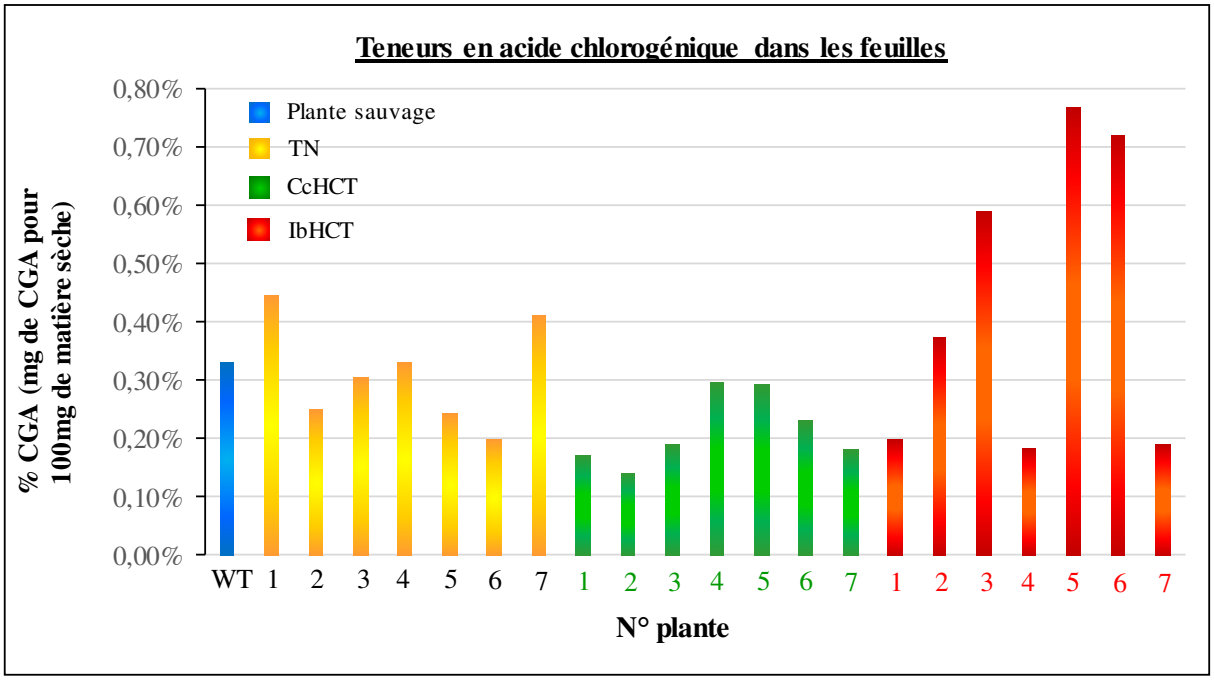


Figure 73 : Teneurs en acide chlorogénique dans les tabacs transformés. TN : Témoin négatif (plantes transformées avec le gène pNep2 utilisé comme contrôle) ; CcHCT : plantes transformées avec le gène CcHCT ; IbHCT : plantes transformées avec le gène IbHCT.

Un autre moyen permettant de vérifier l'activité de l'enzyme est de reproduire le test réalisé en *in vitro* (cf δ 7.2) sur l'enzyme extraite des feuilles de tabacs transgéniques. Nous avons donc incubé un extrait de feuilles broyées en présence d'acide chlorogénique.

3.4 Production de 3,5-DCQ à partir d'extraits de feuilles de tabacs transgéniques

En s'appuyant sur les résultats de transcriptomique, nous avons sélectionné les 3 plantes ayant la plus forte expression des gènes d'intérêt. Pour ces plantes, nous avons broyé les feuilles dans du tampon phosphate pH6. Le broyat a été centrifugé et le surnageant contenant les protéines totales a été récupéré. Après une incubation de l'extrait foliaire à 30°C pendant 4h en présence d'acide chlorogénique, les molécules ont été analysées en HPLC. Nous détectons la présence d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ et nous notons que les teneurs en ces métabolites sont

plus élevées dans les extraits foliaires de tabacs transformés avec les HCT que dans celles dans les plantes contrôle (Figure 74a). En rajoutant de l'acide chlorogénique avant incubation, la quantité d'acide chlorogénique est plus importante dans les trois conditions transgéniques car le substrat a été mis en excès (Figure 74b). Là encore, nous observons que les teneurs en CGA et 3,5-DCQ sont significativement plus fortes dans les extraits foliaires des plantes exprimant les HCT par rapport au contrôle. Elles sont respectivement 5 et 3 fois supérieures pour les extraits foliaires exprimant *IbHCT*. Pour les extraits exprimant *CcHCT*, les teneurs en CGA et en 3,5-DCQ sont 4 et 2 fois plus fortes que celles du contrôle (Figure 74). L'augmentation de la synthèse de 3,5-DCQ semble être associée à une accumulation d'acide chlorogénique. Les HCT d'ipomée et de café semblent donc y jouer un rôle. Aux vues des barres d'erreurs, le type de tissu et son stade de développement peuvent entraîner des variabilités de réponse.

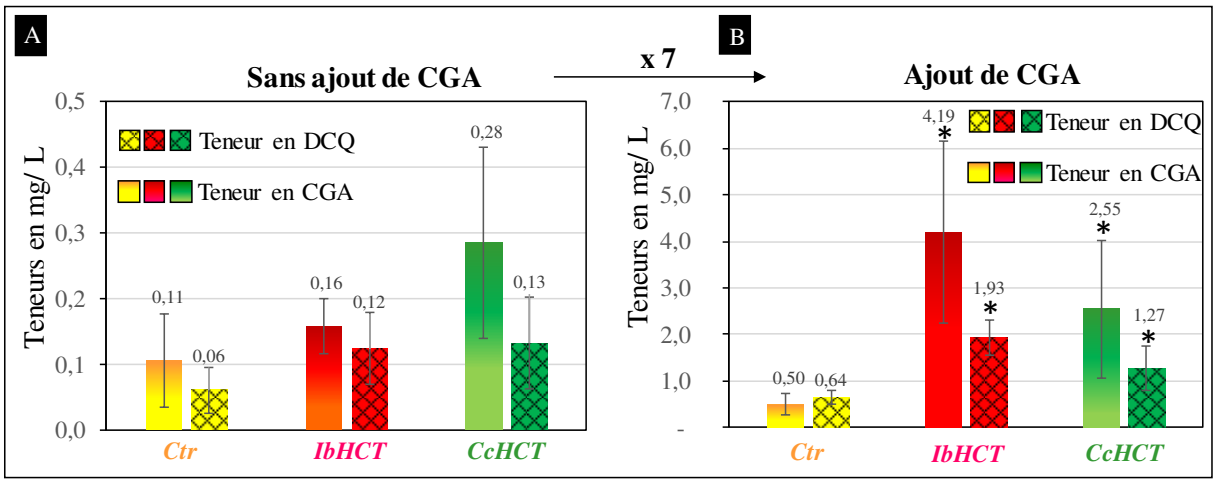


Figure 74 : Teneurs en 3,5-DCQ et en acide chlorogénique dans des extraits de feuilles broyées incubés à 30°C pendant 4h. Comparaison avec et sans ajout d'acide chlorogénique dans le milieu réactionnel. Statistiques réalisées avec un test de Student (valeur p < 5%). Test réalisé sur 3 répétitions biologiques et 3 répétitions expérimentales.

Pour s'affranchir des problèmes d'hétérogénéité tissulaire et s'assurer que le substrat n'est pas en quantité limitante, nous avons réalisé des cultures cellulaires à partir des plantes transgéniques. L'avantage de ce système est de pouvoir travailler sur des lignées cellulaires identiques c'est-à-dire d'avoir une culture homogène de cellules, et de pouvoir ajouter le substrat dans le milieu dans des conditions de culture contrôlées.

3.5 Production des métabolites cibles en cultures cellulaires

Les cultures de cellules végétales sont utilisées en ingénierie métabolique comme méthode de production des métabolites secondaires à valeur thérapeutique (Hellwig *et al.*, 2004). Dans notre cas, le but est de produire du 3,5-DCQ dans des cellules de tabacs transgéniques exprimant des HCT.

Sur les trois lignées transgéniques précédentes de tabac, nous avons réalisé des cultures cellulaires afin de mettre en évidence la production de 3,5-DCQ et d'acide chlorogénique dans des cellules de tabacs exprimant les HCT. Les suspensions cellulaires ont été préparées à partir de cals dérivés de jeunes feuilles. Les cals sont des amas de cellules dédifférenciées qui sont considérées comme des clones, c'est-à-dire qu'elles portent toutes la même information génétique. La formation des cals est contrôlée par une balance hormonale composée de cytokinine et d'auxine à définir pour chaque tissu et chaque espèce végétale. En se basant sur les données bibliographiques concernant la culture *in vitro* de tabac (Gowher *et al*., 2007; Vasilev *et al*., 2014), nous avons rajouté 0,1mg/L de 6-BAP et 0,8mg/mL de NAA au milieu de culture ce qui a mené à la formation de cals friables. Les cellules âgées de 6 semaines ont été mises en suspension dans du milieu MS liquide contenant les régulateurs de croissance et de l'hygromycine. Ayant vu précédemment que l'azote joue un effet sur la synthèse de 3,5-DCQ (cf δ 1.3.2), nous avons induit un stress azoté en vue de stimuler la production des précurseurs utilisés par l'HCT. Deux modalités de milieux de culture ont été testées en parallèle : l'une appelée condition « avec azote » représente un milieu MS contenant tous les éléments essentiels à la croissance et l'autre condition « sans azote » est le même milieu dont on a supprimé toute source d'azote. Afin que le substrat ne soit pas en condition limitante, nous avons incubé les cellules en présence d'acide chlorogénique exogène (2mM) ajouté dans le milieu.

3.5.1 Observations macroscopiques des cultures cellulaires

Après deux semaines de culture, de l'acide chlorogénique a été ajouté dans le milieu et les cultures ont été observées à 0, 24h et 48h après ajout. Nous remarquons qu'en l'absence d'acide chlorogénique exogène, les cellules cultivées ont une couleur marron-claire qui vient de l'apparence des cals prélevés au départ. Cette couleur n'évolue pas au cours du temps quelles que soient les lignées transgéniques (Figure 75). Cependant, dès l'ajout d'acide chlorogénique, les cultures cellulaires changent de couleur et deviennent rouge-brun (Figure 75) mais pas dans les milieux témoin. Ce brunissement est le signe d'une oxydation enzymatique dû à une réaction probable entre des quinones et des composés phénoliques (ex : acide chlorogénique) par des polyphénols oxydases (PPOs) (Murata *et al*., 2002; Yoruk *et al*., 2004). Certains additifs peuvent empêcher ou retarder ce phénomène comme le bisulfite de sodium ($NaHSO_3$) et l'acide ascorbique (Dogan *et al*., 2009). Les observations au microscope ne permettent pas de mettre en évidence de contamination par des micro-organismes et nous ont permis de vérifier que les cellules étaient vivantes dans les deux conditions de culture (avec et sans azote).

Afin de s'assurer que le gène d'intérêt est bien exprimé dans les cellules isolées, nous avons réalisé des analyses de qPCR.

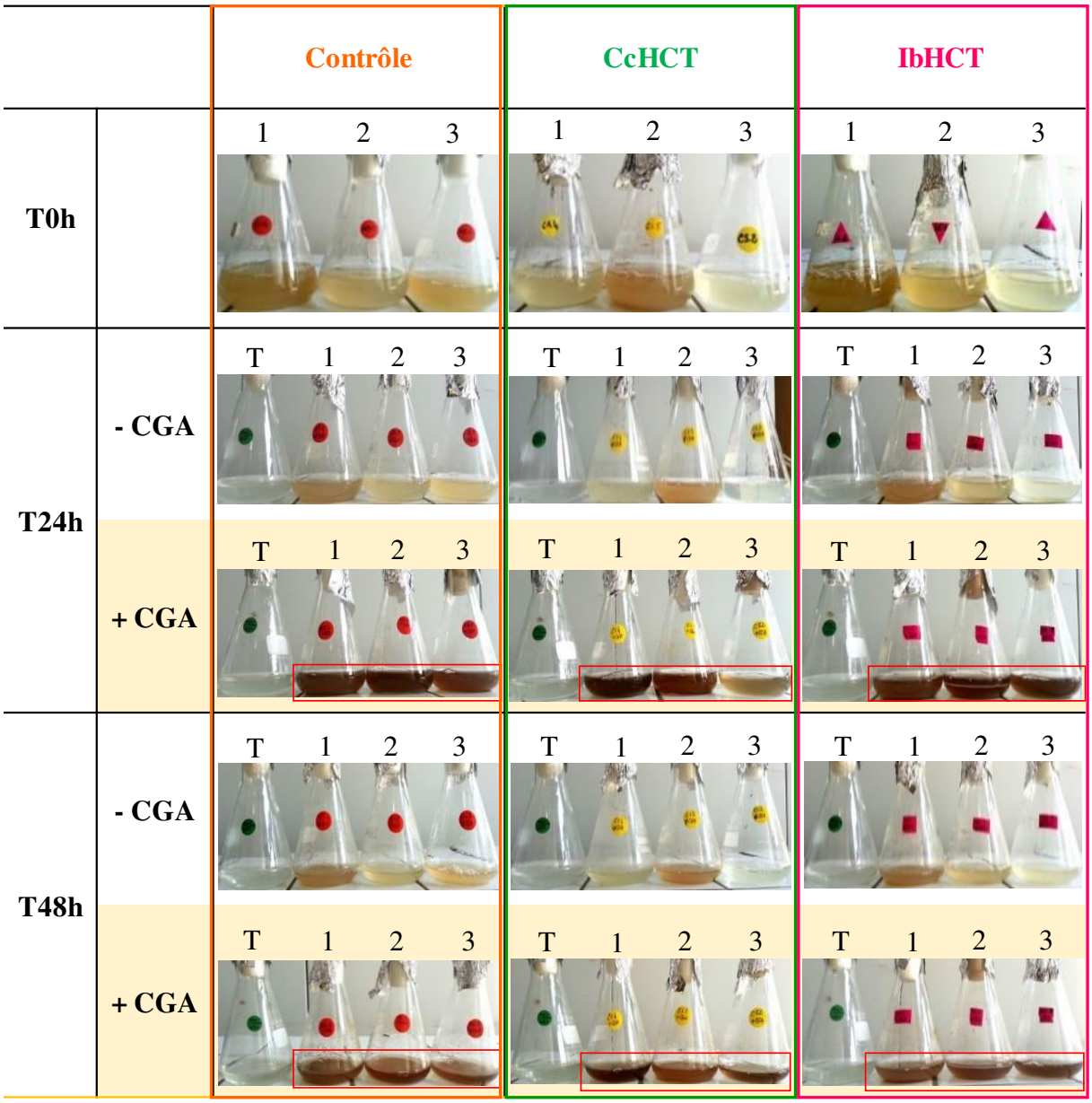


Figure 75 : Photographies des cultures cellulaires incubées sans (-CGA) et avec (+ CGA) acide chlorogénique. T : témoin milieu sans l'inoculum de cellules. Culture des cellules dans un milieu MS additionné des facteurs de croissance et d'hygromycine. Ctrl : cellules de tabac transgéniques utilisées comme témoin négatif. CcHCT : cellules transformées avec le gène codant l'HCT de café. IbHCT : cellules transformées avec le gène codant l'HCT d'ipomée. Les 3 répétitions biologiques (numérotées 1, 2, 3) correspondent aux 3 trois événements de transformation indépendants.

3.5.2 Vérification de l'expression des gènes d'intérêt dans les cultures cellulaires

Les cellules ont été prélevées à T0, 24 et 48h après ajout d'acide chlorogénique et l'expression des gènes d'intérêt a été suivie par PCR en temps réel. La Figure 76 présente les profils d'expression des gènes d'intérêt (HCT café et ipomée) dans les différentes conditions de culture

entre 0 et 24h de culture. Précisons que le contrôle « pNep2 » a été transformé avec une séquence promotrice associée au gène *pNep2* qui n'existe pas chez le tabac. On ne détecte donc pas l'expression de ce gène. Concernant le gène *CcHCT*, l'expression est détectée dans toutes les lignées cellulaires à 0 et 24h, ce qui indique que le gène continue à s'exprimer au cours de la culture (Figure 76a). Cette expression est bien spécifique du gène d'intérêt puisqu'elle n'est pas détectée dans le contrôle (cellules transgéniques sans les gènes *HCT*).

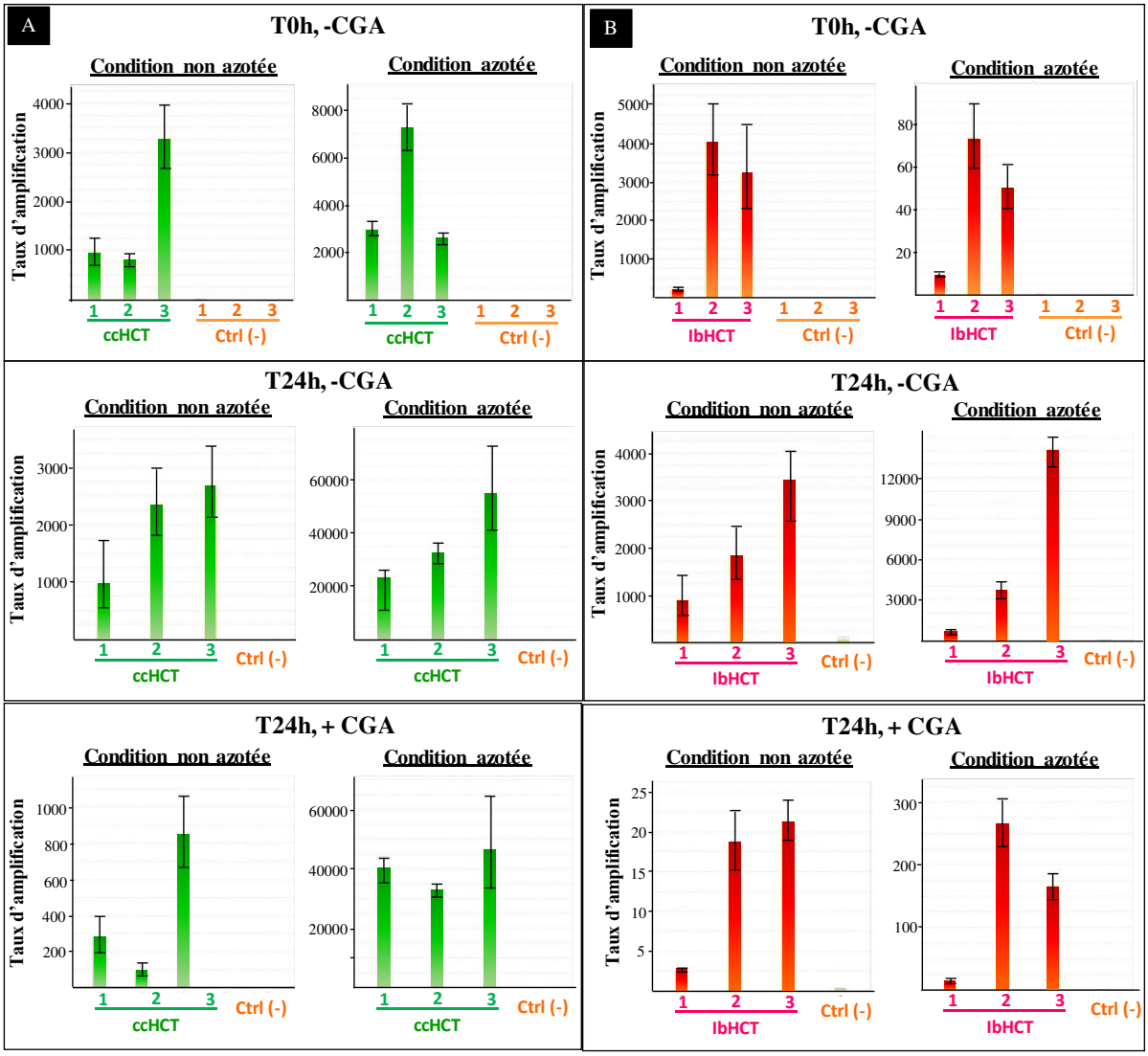


Figure 76 : Vérification de l'expression des gènes au cours de la culture des cellules de tabacs transformés avec les gènes codant les HCT. qPCR réalisée à partir des ARN extraits des cellules. A : expression du gène CcHCT. B : expression du gène IbHCT. Ctrl (-) : cellules transgéniques sans le gène d'intérêt.

Le gène s'exprime aussi bien en présence qu'en l'absence d'acide chlorogénique ainsi que dans les conditions avec et sans azote, ce qui est évident puisque le gène est sous le contrôle du promoteur P35S. Mais comme il s'agit d'une expression relative, il n'est pas possible de comparer le niveau d'expression d'une condition à l'autre.

Dans le cas des cellules transformées avec le gène *IbHCT*, l'expression est détectée dans les 3 lignées transgéniques quelles que soient les conditions de culture (Figure 76b). Cependant chez la lignée 1, l'expression du gène d'intérêt est beaucoup plus faible que chez les lignées 2 et 3, alors qu'elle était très forte dans la plante (Figure 71a).

Ces résultats nous montrent que l'expression des gènes d'intérêt est maintenue dans les cellules en culture même après ajout d'additifs (acide chlorogénique, hormones) et dans un milieu avec ou sans azote.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'azote et de l'acide chlorogénique sur la croissance cellulaire.

3.5.3 Effet de l'ajout d'acide chlorogénique sur la croissance cellulaire

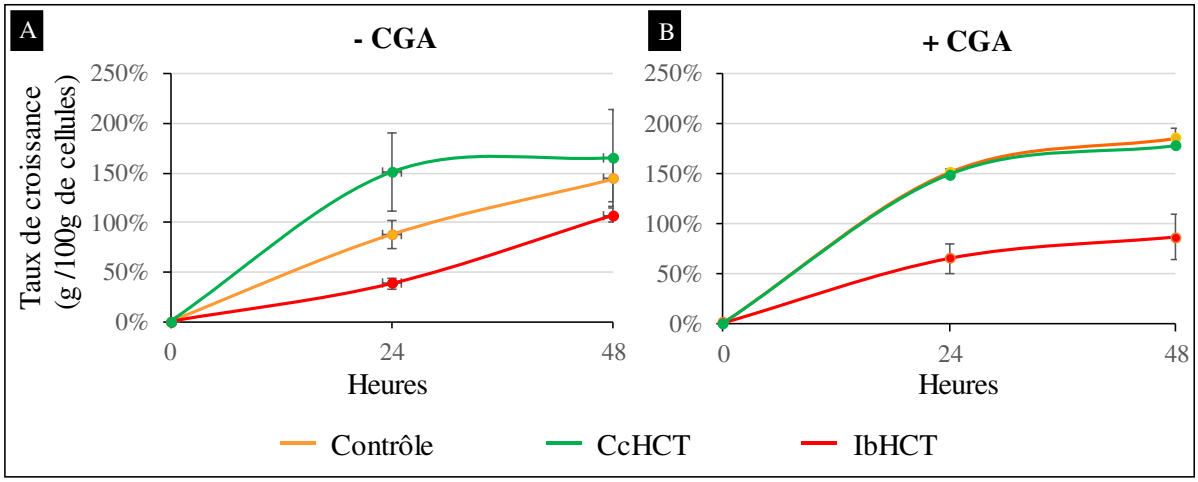


Figure 77 : Taux de croissance des cellules transgéniques déterminé à partir de la biomasse fraîche. Les analyses ont été réalisées sur 3 répétitions biologiques (3 lignées transgéniques indépendantes). Ctrl (-) : cellules transgéniques sans le gène d'intérêt. CcHCT : HCT de café. IbHCT : HCT d'ipomée. A : sans ajout d'acide chlorogénique dans le milieu de culture. B : ajout d'acide chlorogénique (2mM).

La croissance des cellules a été évaluée par rapport au taux de croissance calculé à partir de la biomasse fraîche des cellules prélevées à T0, 24, et 48h. Le taux de croissance a été déterminé pour chaque lignée transgénique. En l'absence d'acide chlorogénique, la croissance cellulaire évolue positivement au cours des 24h, puisque la biomasse et la densité cellulaire sont plus importantes qu'au départ, ce qui signifie que les cellules se sont multipliées. Cependant nous notons des différences de croissance cellulaire après 24h entre les différentes constructions génétiques (Contrôle, CcHCT et IbHCT). Les cellules transformées avec le gène *HCT* de café ont une croissance plus importante (Figure 77) entre 0 et 24h. Et, après 48h, cette vitesse de croissance diminue rapidement. Après ajout d'acide chlorogénique, nous observons ce même cas de figure. Deux raisons peuvent expliquer cela : soit les cellules ont arrêté de se multiplier soit il y a un équilibre compensatoire de cellules mortes/cellules vivantes. Dans le cas des

cellules exprimant l'HCT d'ipomée, on observe que la vitesse de croissance des cellules est significativement plus faible que celle du contrôle. Plusieurs explications peuvent répondre à cela : 1) la croissance des cellules peut être inhibée par des composés synthétisés par l'HCT d'ipomée ; 2) comme l'insertion est aléatoire, il est possible que le gène *IbHCT* se soit inséré à un locus du génome pouvant éteindre un gène important pour la division cellulaire (Pfeffer *et al*., 2003) ; 3) Cette différence de biomasse peut dépendre non pas de la quantité de cals de départ, mais du nombre de cellules vivantes présentes au départ.

3.5.4 Effet de la carence azotée sur la croissance cellulaire

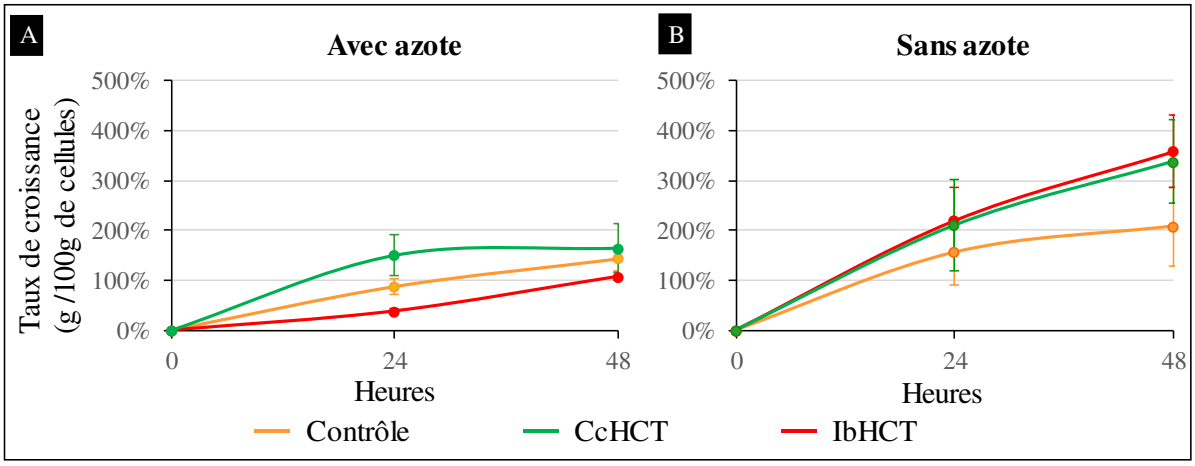


Figure 78 : Comparaison du taux de croissance des cellules cultivées avec ou sans azote. Ctrl (contrôle) : cellules transgéniques dépourvues du gène d'intérêt. CcHCT : cellules exprimant le gène codant l'HCT de café. IbHCT : cellules exprimant le gène codant l'HCT d'ipomée.

Afin d'étudier l'effet de l'azote sur la croissance cellulaire, nous avons comparé le taux de croissance des cellules entre les conditions de culture « avec azote » et « sans azote ». La Figure 78 représente le taux de croissance cellulaire déterminé entre 0 et 48h de culture en présence et en absence d'azote. Après 24h de culture dans un milieu azoté, la croissance des cellules exprimant le gène codant l'HCT de café augmente par rapport au contrôle tandis qu'elle diminue dans le cas des cellules transformées avec le gène codant l'HCT d'ipomée (Figure 78a). Les analyses statistiques réalisées avec Anova montrent que ces données sont significatives. Au bout de 48h de culture, la croissance cellulaire est inchangée entre les cellules contrôle et les cellules exprimant les HCT (Figure 78a). Dans le cas des cellules exprimant l'HCT d'ipomée et cultivées sans azote, le taux de croissance tend à augmenter par rapport à celles cultivées en présence d'azote (Figure 78a et b), bien que ces résultats ne soient pas significatifs. Comme vu précédemment (δ 2.4 et δ 2.5), l'enzyme montre des spécificités de substrats qui pourraient agir sur la croissance cellulaire. Cet effet peut être dû au 3,5-DCQ ou à d'autres molécules. La croissance cellulaire n'est pas diminuée après 48h quelles que soient les conditions, ce qui signifie que les cellules de tabac ont une capacité de croissance robuste

en condition d'azote limitant probablement grâce à une réserve d'azote endogène suffisante pour une période de culture de 48h.

Dans l'ensemble, l'absence d'azote ne semble pas avoir d'impact négatif sur la croissance des cellules, mais au contraire stimulerait la croissance des cellules transformées avec les gènes codant l'HCT d'ipomée.

Nous avons vu ici que l'absence d'azote a une influence sur la croissance des cellules transformées avec les HCT. On peut penser que l'HCT d'ipomée joue un rôle dans la synthèse de molécules ayant un effet négatif sur la croissance cellulaire. Nous nous sommes focalisés sur la synthèse de 3,5-DCQ, étant l'objectif de notre étude. Nous avons alors vérifié si l'expression des gènes codant les HCT dans des cellules de tabac conduit à une surproduction de 3,5-DCQ. Afin de s'assurer que la production des métabolites cibles provient bien des cellules, nous avons dosé séparément les molécules dans le milieu de culture et dans les cellules.

3.5.5 Recherche de la présence des métabolites dans le milieu de culture

Comme évoqué précédemment (cf. δ 2.4.1 et δ 2.4.2), l'HCT d'ipomée catalyse la synthèse d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ. Nous nous sommes demandés si les cellules exprimant les HCT excrétaient de l'acide chlorogénique dans le milieu. Nous avons donc analysé la teneur en métabolites cibles par HPLC. La méthode d'analyse a été optimisée pour détecter l'acide chlorogénique. Dans le milieu azoté, la concentration en acide chlorogénique reste inchangée avec ou sans ajout d'acide chlorogénique. Une augmentation très légère est observée à 48h pour les cellules transformées avec l'HCT de café, mais la concentration reste très minime (9,6mg/L) (Figure 79a).

Dans le milieu non azoté, aucune différence de teneur en acide chlorogénique dans les cultures de cellules exprimant les HCT n'est observée à 24 et 48h par rapport au contrôle. Lorsqu'on ajoute de l'acide chlorogénique, la concentration augmente considérablement pour les 3 conditions transgéniques, puis tend à diminuer à 48h (Figure 79b).

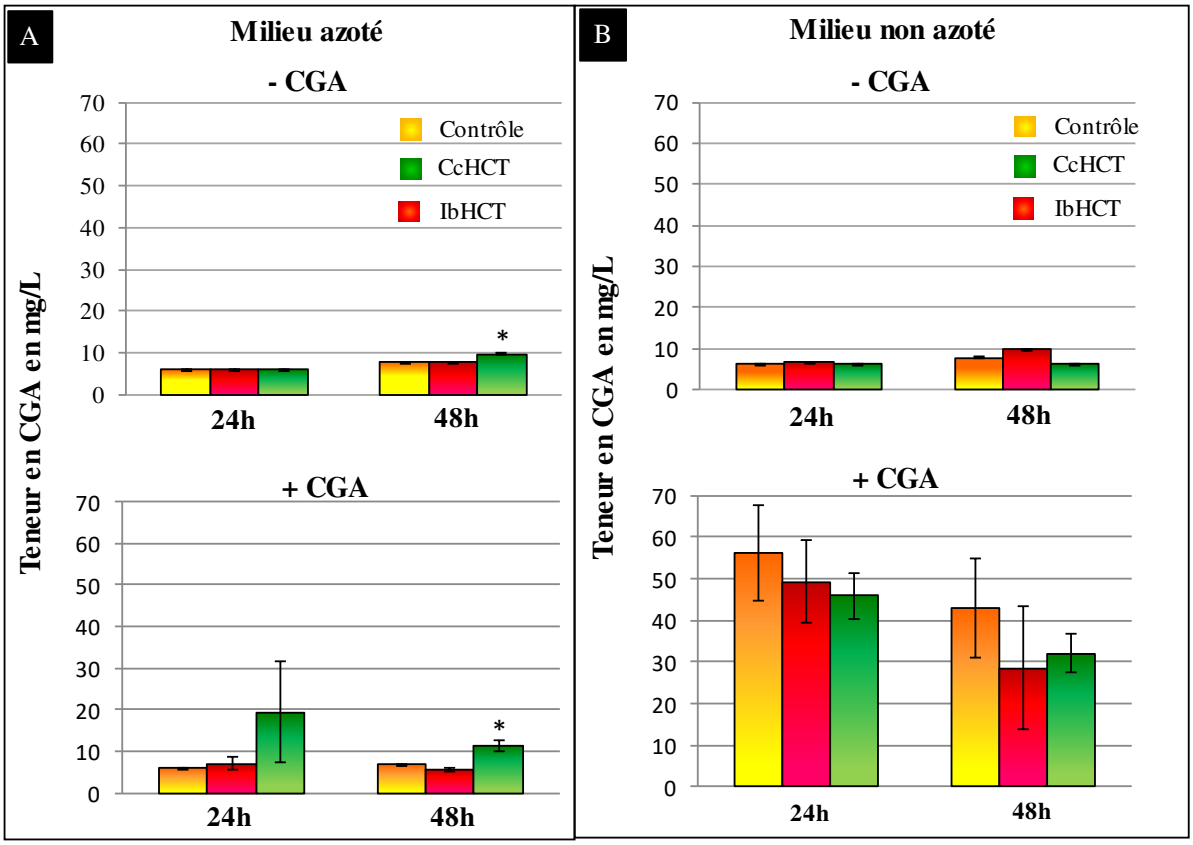


Figure 79 : Teneurs en acide chlorogénique (en mg/L) dans le milieu de culture prélevé à 24 et 48h. A : milieu azoté. B : milieu non azoté. Contrôle : milieu contenant les cellules de tabac transformées avec le gène pNep2. (-CGA) : sans acide chlorogénique ; (+CGA) : ajout d'acide chlorogénique 2mM. CcHCT et IbHCT : milieux contenant les cellules de tabac transgéniques exprimant les HCT.

Plusieurs raisons peuvent expliquer la disparition de l'acide chlorogénique : soit l'acide chlorogénique s'est dégradé dans le milieu, soit une partie de l'acide chlorogénique a été absorbée et métabolisée dans la cellule, soit l'acide chlorogénique a subi une oxydation par les polyphénols oxydases présentes dans les cellules. Le moyen permettant de vérifier ces hypothèses serait de faire un radiomarquage de la molécule.

En parallèle, nous avons analysé la teneur en 3,5-DCQ dans ces milieux. Dans le milieu azoté, la concentration en 3,5-DCQ est plus élevée dans les conditions transgéniques HCT par rapport au contrôle, mais elle reste cependant très faible (entre 0,014 et 0,078mg/L) (Figure 80a). Après ajout d'acide chlorogénique, la concentration en 3,5-DCQ augmente jusqu'à 0,57mg/L pour l'HCT de café après 24h de culture.

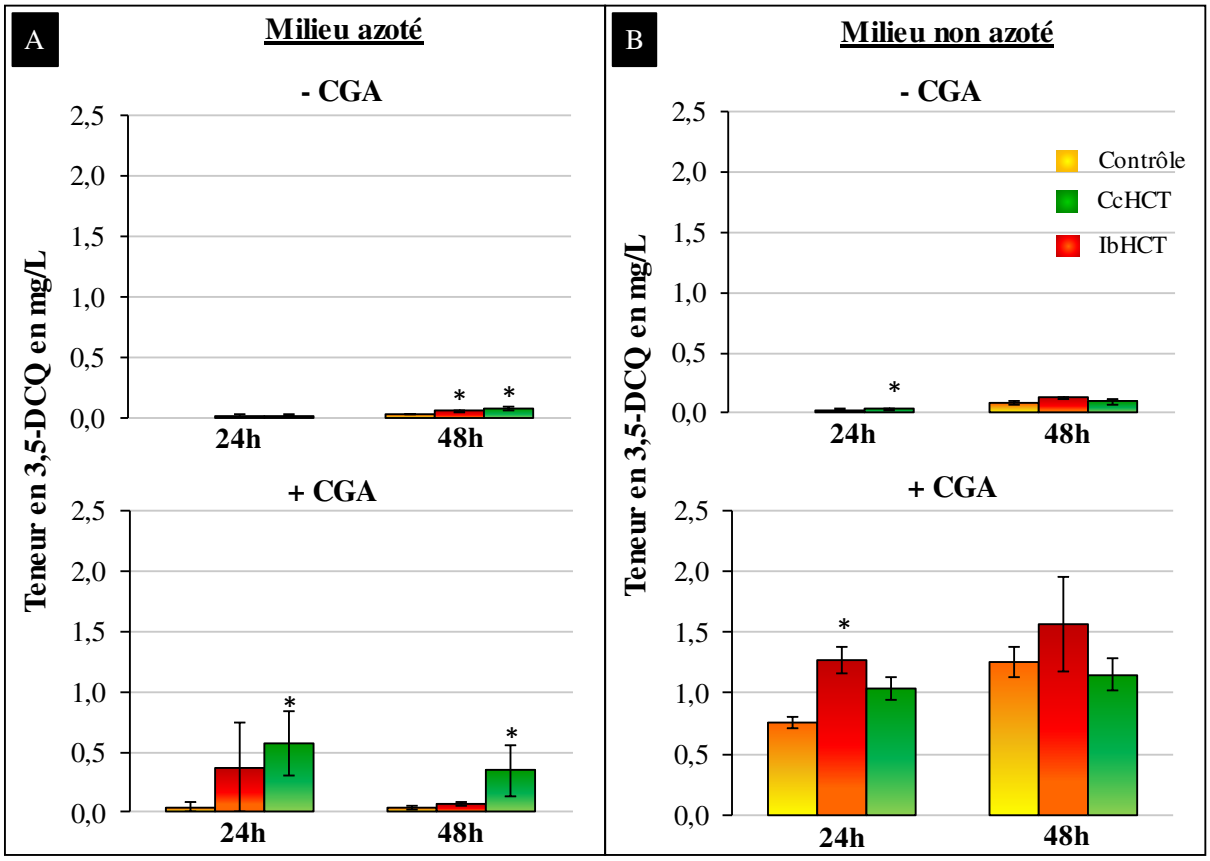


Figure 80 : Teneur en 3,5-DCQ (en mg/L) dans le milieu de culture. A : milieu azoté. B : milieu non azoté. Contrôle : milieu contenant les cellules de tabacs transformées avec le gène pNep2. (-CGA) : sans acide chlorogénique ; (+CGA) : ajout d'acide chlorogénique 2mM. CcHCT et IbHCT : milieux contenant les cellules de tabac transgéniques exprimant les HCT.

Dans le milieu non azoté, les teneurs en 3,5-DCQ dans le milieu des cellules transgéniques expriment les HCT ne sont pas différentes de celle du contrôle. En revanche, les concentrations en 3,5-DCQ augmentent fortement après ajout d'acide chlorogénique, mais elle augmente également dans le contrôle (Figure 80b). Il semble donc que l'acide chlorogénique en excès dans le milieu favorise la synthèse de 3,5-DCQ. Ces données soutiennent les observations précédentes indiquant le lien entre l'accumulation d'acide chlorogénique et la synthèse de 3,5-DCQ (cf. δ 3.4). Or, aucune trace de 3,5-DCQ n'a été décelée dans les milieux « témoin ». Cela signifie que le 3,5-DCQ est bien excrété par les cellules dans le milieu.

Nous avons ensuite analysé les teneurs en acide chlorogénique et 3,5-DCQ dans les cellules.

3.5.6 Production d'acide chlorogénique et de DCQ dans les cellules exprimant les HCT

Afin de savoir si les cellules exprimant les HCT produisent plus de DCQ et d'acide chlorogénique, nous avons broyé les cellules et préparé des extraits hydro-éthanoliques et dosé les métabolites cibles par HPLC avec la même méthode utilisée pour les milieux de culture.

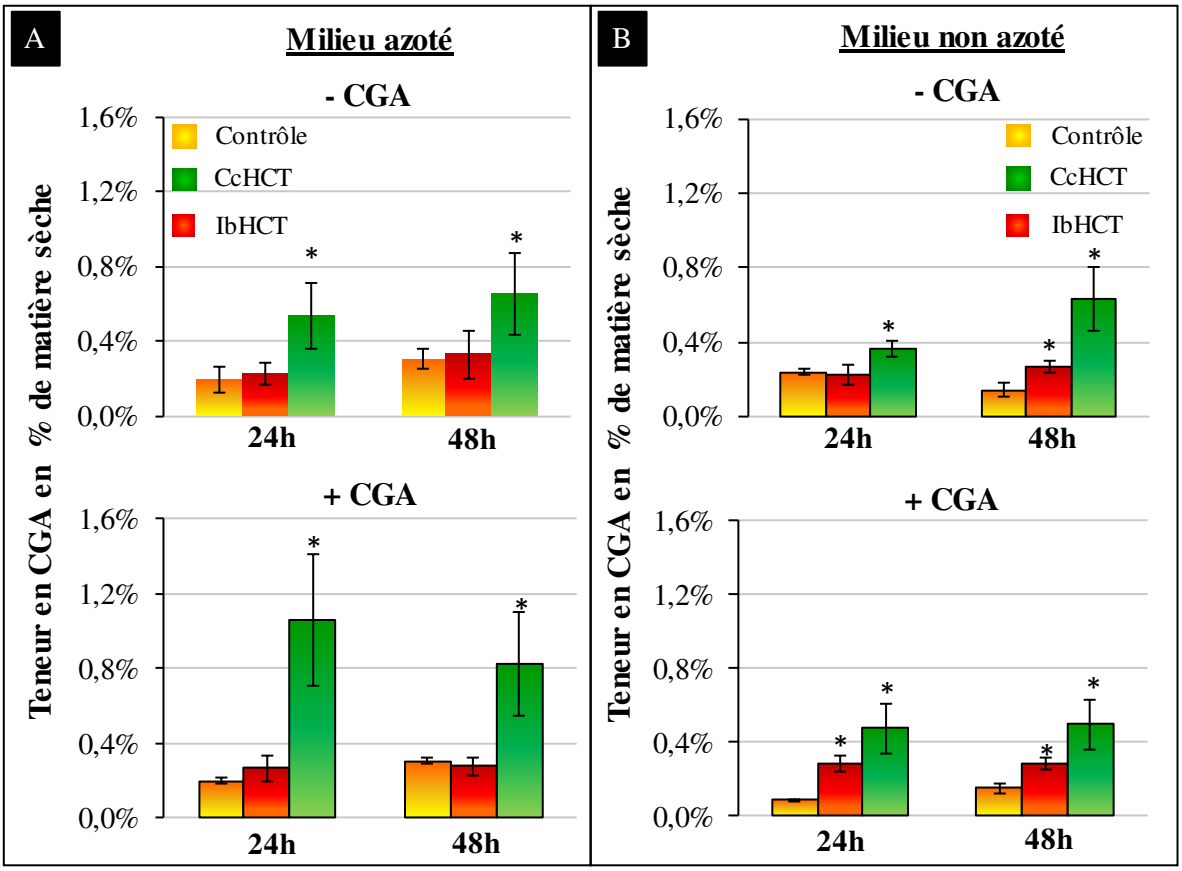


Figure 81 : Teneurs en acide chlorogénique dans les cellules transformées. A : condition azote non limitant. B : condition sans azote. Contrôle : cellules de tabac transgénique dépourvues du gène d'intérêt. Les teneurs sont exprimées en % de matière sèche (g de DCQ pour 100g de matière sèche).

Nous avons d'abord analysé la teneur en acide chlorogénique dans les cellules cultivées en condition d'azote non limitant. Dans les cellules exprimant l'HCT d'ipomée, nous n'observons pas de différences significatives par rapport aux cellules contrôle. En revanche, on observe que la teneur en acide chlorogénique augmente dans les cellules exprimant l'HCT de café (Figure 81a). Cette augmentation est plus importante lorsque l'acide chlorogénique est en excès.

En condition d'azote limitant, les teneurs en acide chlorogénique sont plus fortes dans les cellules exprimant les HCT d'ipomée et de café (Figure 81b). Les mêmes observations sont faites après addition d'acide chlorogénique. Ces teneurs ne sont cependant pas plus importantes

qu'en condition azotée contrairement à des études montrant qu'une carence en azote augmente la teneur en acide chlorogénique (Armstrong *et al.*, 1970; Fritz *et al.*, 2006).

Ces résultats indiquent que les cellules exprimant les HCT produisent plus d'acide chlorogénique que les cellules contrôle.

En parallèle de l'analyse des concentrations en CGA, nous avons évalué les teneurs en DCQ dans ces cellules.

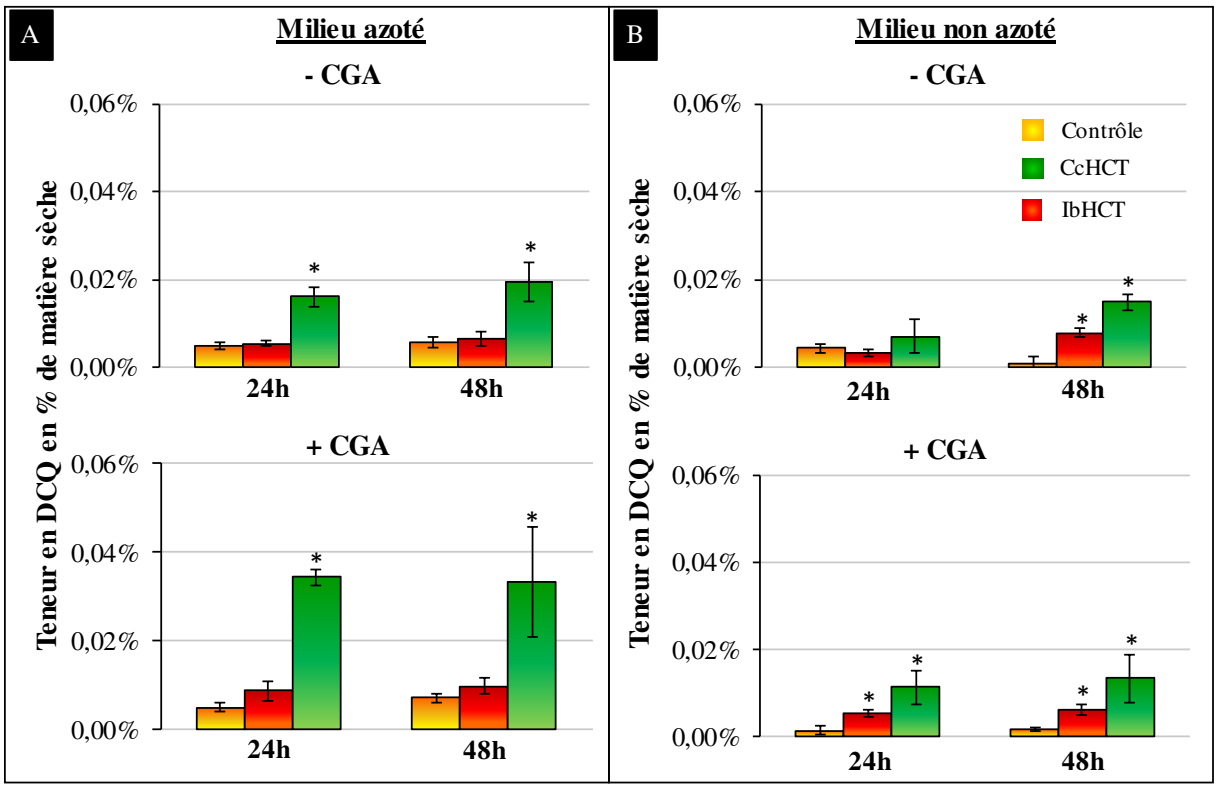


Figure 82 : Teneurs en 3,5-DCQ dans les cellules de tabac transgénique. A : condition azote non limitant. B : condition sans azote. Contrôle : cellules de tabac transgénique dépourvues du gène d'intérêt. Les teneurs sont exprimées en % de matière sèche (g de DCQ pour 100g de matière sèche).

Nos analyses indiquent que les cellules contrôle produisent les 3 isomères de DCQ (3,4-, 3,5- et 4,5-DCQ) (Figure 82a). Cette observation est cohérente avec des travaux antérieurs montrant que les cultures cellulaires de tabac produisaient du 3,4- et du 4,5-DCQ (Mhlongo *et al.*, 2014). Cette production de DCQ est significativement plus importante dans les cellules transformées avec l'HCT de café par rapport au contrôle et augmente davantage en rajoutant le précurseur (l'acide chlorogénique) dans le milieu de culture. Cette teneur atteint jusqu'à 0,03% de matière sèche (MS) en 24h, soit 5 fois plus que le contrôle. Dans le cas de l'HCT d'ipomée, cette surproduction n'est pas significative.

En condition non azotée, on retrouve quasiment le même profil de teneur qu'en présence d'azote. On note qu'il y a une augmentation significative de la teneur en 3,5-DCQ dans les cellules exprimant l'HCT d'ipomée qui peut atteindre 0,01% (MS) à 48h (Figure 82b).

3.5.7 Discussion relative à la production d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ *in planta* et dans les cultures cellulaires

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons généré par une approche de transgénèse des plantes exprimant de façon stable les gènes codant les HCT de café et d'ipomée. Etant donné que la synthèse des métabolites dépend non seulement de l'expression du gène d'intérêt mais aussi d'un certain nombre de facteurs (développementaux, localisation subcellulaire, substrat limitant), nous avons mis en évidence un test d'incubation *in vitro* avec un extrait protéique de feuilles de tabacs exprimant les HCT. Ces résultats ont démontré que ces HCT sont capables de synthétiser de l'acide chlorogénique et du DCQ. De plus, l'ajout d'acide chlorogénique conduit à une surproduction de DCQ donc cela indique qu'il existe une relation entre l'accumulation de CGA et la synthèse de DCQ. Des observations similaires ont été rapportées dans une étude sur l'HCT de café possédant cette double activité (Lallemand *et al*., 2012). L'hypothèse qu'il en ressort est que les HCT et HQT agissent sur la synthèse de 3,5-DCQ qu'en présence de fortes concentrations d'acide chlorogénique (Lallemand *et al*., 2012; Moglia *et al*., 2014).

Pour s'affranchir des problèmes d'hétérogénéité tissulaire, nous avons réalisé des cultures cellulaires et avons testé l'effet de la nutrition azotée et de l'acide chlorogénique exogène sur la croissance cellulaire et la synthèse des métabolites cibles. Nous avons observé qu'en présence d'acide chlorogénique, il se produit une oxydation enzymatique des cellules qui se traduit par un brunissement du milieu. Mais cette oxydation n'induit pas une toxicité des cellules puisque la croissance cellulaire continue à évoluer entre 0 et 48h d'incubation. De plus, ces cellules ont maintenu l'expression du gène d'intérêt pendant la période d'incubation (d'au moins 24h) aussi bien en présence qu'en absence d'azote. Nous avons également noté que la privation en azote joue un effet positif sur la croissance des cellules car la croissance des cellules augmente considérablement au bout de 48h de culture. Cela indique que les cellules ont une réserve d'azote interne suffisante pour prolonger la période de croissance. Des résultats similaires obtenus sur la croissance des micro-algues de *Chlorella sorokiniana* augmentant jusqu'à 14 jours de culture sans azote confortent ces observations (Negi *et al*., 2015). Cet effet peut être également en lien avec la régulation hormonale, comme cela été déjà démontré dans le cas des flavonols qui inhibent le transport de l'auxine (Kuhn *et al*., 2011). Rappelons que le contrôle utilisé dans ces analyses était un gène codant un promoteur. Selon son insertion dans le génome de l'hôte, celui-ci peut engendrer une modification de l'expression de certains gènes.

Sur le plan phytochimique, nous avons montré que l'expression hétérologue des HCT dans les cultures cellulaires de tabac conduit à une surproduction d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ. La teneur en DCQ peut atteindre jusqu'à 0,03% MS pour l'HCT de café et 0,01% pour l'HCT d'ipomée. Une expérience de culture cellulaire à partir de racines de patate douce arrivait à un

taux de 0,08% de DCQ (Konczak *et al*., 2004). En ajoutant de l'acide chlorogénique, la teneur en DCQ est augmentée d'un facteur 5 pour l'HCT de café et d'un facteur 2 pour l'HCT d'ipomée. Notons cependant que l'acide chlorogénique ajouté dans le milieu est susceptible d'être dégradé par le phénomène d'oxydation dû aux polyphénols oxydases. Ces métabolites sont bien excrétés par les cellules puisqu'ils sont présents dans le milieu jusqu'à des concentrations de 20mg/L de CGA semblables à la quantité produite dans des cultures de *E. coli* co-exprimant l'HQT, l'HCT et la 4CL (Kim *et al*., 2013). Mais la concentration en DCQ restait néanmoins beaucoup plus faible (1,5mg/L). Les méthodes d'analyses ont été mises au point pour la détection d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ, bien que la présence d'autres substrats préférentiellement utilisés par l'HCT d'ipomée n'est pas négligeable. Il serait intéressant de quantifier les autres molécules potentiellement produites à des teneurs plus ou moins importantes afin de distinguer les voies primaires et secondaires des HCT. L'incubation avec d'autres substrats que l'acide chlorogénique serait un moyen permettant d'identifier de nouveaux produits.

En menant en parallèle les expériences de cultures cellulaires sur les deux HCT, celle de café et celle d'ipomée, nous avons vu que celles-ci présentent des profils différents en termes de teneurs en 3,5-DCQ dans les cellules et en termes de croissance cellulaire. Les cellules exprimant l'HCT d'ipomée croient moins vite que celles exprimant l'HCT de café. Les deux enzymes peuvent avoir des rôles différents dans la synthèse de certains composés. Ayant évoqué précédemment des différences au niveau des séquences primaires des deux protéines, on peut également supposer des différences structurales pouvant expliquer les spécificités de substrats des HCT de café et d'ipomée. On peut là encore évoquer l'existence d'une évolution divergente de ces enzymes dont la fonction aurait évolué vers d'autres voies de biosynthèse (Ober, 2005, 2010). Etant donné les faibles proportions de 3,5-DCQ produites par ces deux enzymes, il semblerait que la synthèse de 3,5-DCQ n'est pas la fonction principale de ces deux enzymes.

D'après ces résultats, les teneurs en 3,5-DCQ obtenues dans les tabacs transgéniques exprimant l'HCT d'ipomée (0,16% MS) sont très faibles par rapport à celles obtenues (jusqu'à 8% MS) dans les ipomées cultivées en aéroponie (Figure 37). Plusieurs raisons peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat. La première explication pourrait être que l'HCT n'est pas l'enzyme clé de la voie de biosynthèse du 3,5-DCQ. Une seconde explication pourrait résider dans le fait que le susbtrat pourrait être un facteur limitant. L'acide chlorogénique utilisé dans d'autres voies métaboliques pourrait être indisponible pour permettre la synthèse de 3,5-DCQ. Une troisième explication pourrait venir du fait que le gène d'ipomée a été exprimé dans le tabac. Il n'est pas impossible que ce modèle végétal ne soit pas optimal. La production de 3,5-DCQ pourrait être améliorée en choisissant une espèce végétale autre que le tabac, et produisant de façon basale de fortes quantités de précurseurs de la voie cible. Chez la tomate, une HQT a été identifiée et joue un rôle dans cette voie de biosynthèse (Moglia *et al*., 2014). Il semble que cette enzyme a une double activité, c'est-à-dire qu'elle peut catalyser la synthèse d'acide chlorogénique ou de 3,5-DCQ selon si elle est dans la vacuole ou dans le cytoplasme (Moglia *et al*., 2014). A ce jour, seule l'implication de cette famille d'acyltransférases dans cette voie

de biosynthèse n'a été démontrée, mais il n'est pas exclu qu'elles ne soient pas les seules responsables. La production majeure de 3,5-DCQ chez l'ipomée pourrait être assurée par d'autres enzymes différentes de cette famille. Plusieurs voies peuvent être proposées. Des travaux antérieurs ont suggéré l'implication potentielle de deux enzymes qui utiliseraient des intermédiaires de caféoyl-glucosides: une UDP-glucose : *t*-cinnamate glucosyl transférase et une hydroxycinnamoyl D-glucose : quinate hydroxycinnamoyl transférase (Villegas et Kojima, 1986). Plus récemment, des chercheurs ont isolé une activité enzymatique de synthèse de DCQ à partir de coupes de tubercule de patate douce incubées en présence d'acide chlorogénique. Par une approche de séquençage peptidique, ils ont identifié une enzyme dont la taille est de 28 kDa (contre 50 kDa pour l'HCT) (Legrand, thèse 2015). D'après des analyses sur des bases de données végétales disponibles sur Internet, cette séquence se rapproche d'enzymes de taille d'environ 40 kDa. Sa séquence peptidique présente des motifs caractéristiques de la superfamille des hydrolases SGNH et qui est très proche du point de vue de sa séquence nucléotidique à une GDS-estérase/lipase de tomate, la chlorogénate : glucarate caféoyltransférase SICGT (64% de similarité) (Legrand, 2015). Cette dernière est impliquée dans la formation de caféoyl-glucarate et de caféoyl-galactarate à partir d'acide chlorogénique (Teutschbein *et al*., 2010). D'après ces travaux, cette enzyme aurait perdu son activité hydrolytique et adopté une nouvelle fonction, à savoir le rôle d'une acyltransférase dans la synthèse de dérivés d'acides hydroxycinnamiques (Teutschbein *et al*., 2010). Ces enzymes sont donc de nouvelles pistes à explorer.

Outre les approches de transgénèse permettant de surexprimer le gène codant pour l'HCT dans le tabac, il est maintenant possible d'envisager une approche de Knock Out du gène grâce aux méthodes d'édition de gènes apparues depuis quelques années ou encore des approches Knock Down avec des approches VIGS. Ces approches seront envisagées dans la poursuite de ce projet.

La transgénèse est souvent un outil utilisé en agronomie pour apporter une caractéristique supplémentaire à la plante comme une résistance à une maladie. Certains dérivés d'acide caféoyl-quinique ont été décrits pour avoir des effets antimicrobiens (cf δ 2.5.3.1). Nous nous sommes alors demandés si les plantes surexprimant les HCT pourraient présenter une résistance accrue à des maladies fongiques.

3.6 Tests de résistance des plantes transgéniques aux maladies fongiques

3.6.1 Etude de l'effet des molécules cibles sur la croissance du mycélium

Botrytis cinerea et *Phytophthora parasitica* sont des espèces fongiques sensibles au 3,4-DCQ et au 1,5-DCQ (Dan *et al*., 2010; Chen *et al*., 2013). Nous avons testé l'effet direct du 3,5-DCQ et de l'acide chlorogénique sur la croissance de ces deux champignons. Pour cela, le test a été réalisé en triplicata avec des disques d'agar inoculés avec les champignons placés dans des boîtes de Pétri. Nous avons incorporé les molécules pures à différentes concentrations dans des

milieux de culture. La croissance mycélienne a été évaluée en mesurant tous les jours le diamètre du tapis d'hyphes. Ces données ont permis de déterminer le pourcentage d'inhibition fongique (%).

Au préalable nous avons testé indépendamment l'effet des solvants et le pH des solutions correspondant aux molécules. Afin de savoir si le pH a une influence sur la croissance du mycélium, nous avons préparé une modalité à pH3 correspondant au pH des solutions d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ et une modalité à pH6 correspondant au pH de la solution de chitosan. Les Figure 83a et c montrent que le diamètre des champignons n'est pas différent entre le pH3, le pH6 et le témoin eau (Figure 83a et c).

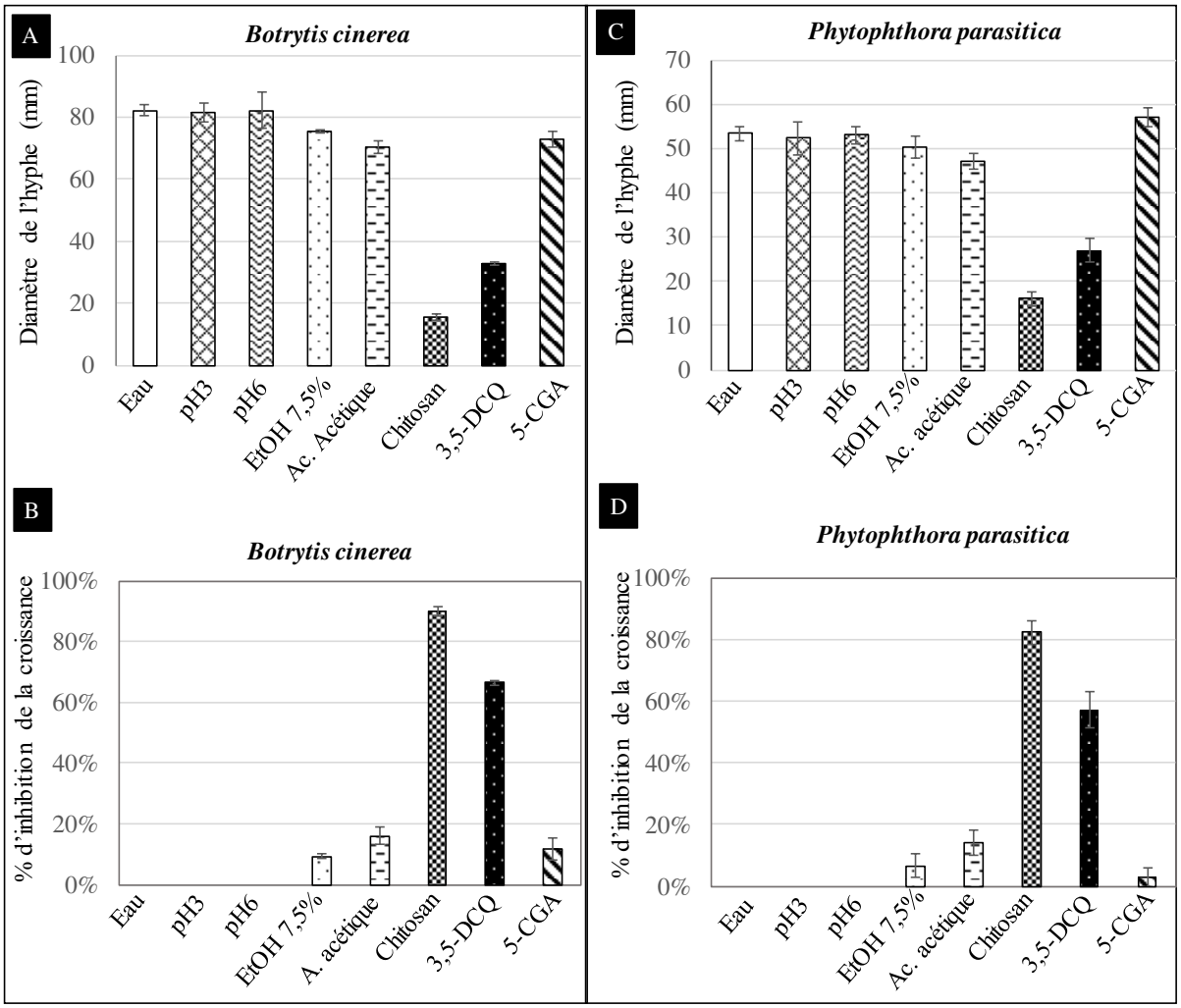


Figure 83 : Effet des témoins solvants et du pH sur la croissance mycélienne de Botrytis cinerea et Phytophthora parasitica. A et C : Mesure du diamètre de l'hyphe après 5 jours de culture de Botrytis cinerea à 20°C à l'obscurité et 6 jours de culture de Phytophthora parasitica à 25°C à l'obscurité. B et D : pourcentage d'inhibition de la croissance de l'hyphe. Les témoins sont comparés par rapport aux trois molécules testées à 500mg/L.

Nous avons en parallèle testé l'effet des solvants sur la croissance mycélienne. Pour cela, nous avons préparé des milieux contenant le solvant dans lequel la molécule a été préparée. On remarque que le diamètre du champignon *Botrytis cinerea* est diminué en présence d'éthanol 7,5% et d'acide acétique 0,5%+Tween-20 0,5%. L'éthanol 7,5% inhibe 9% (+/-1%) et l'acide acétique+Tween20 inhibe 16% (+/-3%) de la croissance fongique (Figure 83b). L'acide acétique+Tween-20 induit une diminution de la croissance de *Phytophthora parasitica* de 14% (+/-4%) (Figure 83c et d). On note également une légère inhibition de 7% (+/-4%) par l'éthanol 7,5% sur ce champignon.

Cependant le chitosan et le 3,5-DCQ répriment respectivement de 90% (+/- 2%) et 67% (+/-1%) la croissance de *Botrytis cinerea* (Figure 83b). Ces molécules exercent respectivement une inhibition de 82% (+/-4%) et de 57% (+/-5%) sur la croissance de *Phytophthora parasitica* (Figure 83d). Nous avons donc tenu compte de l'inhibition causée par l'éthanol et l'acide acétique+Tween 20 pour les essais suivants.

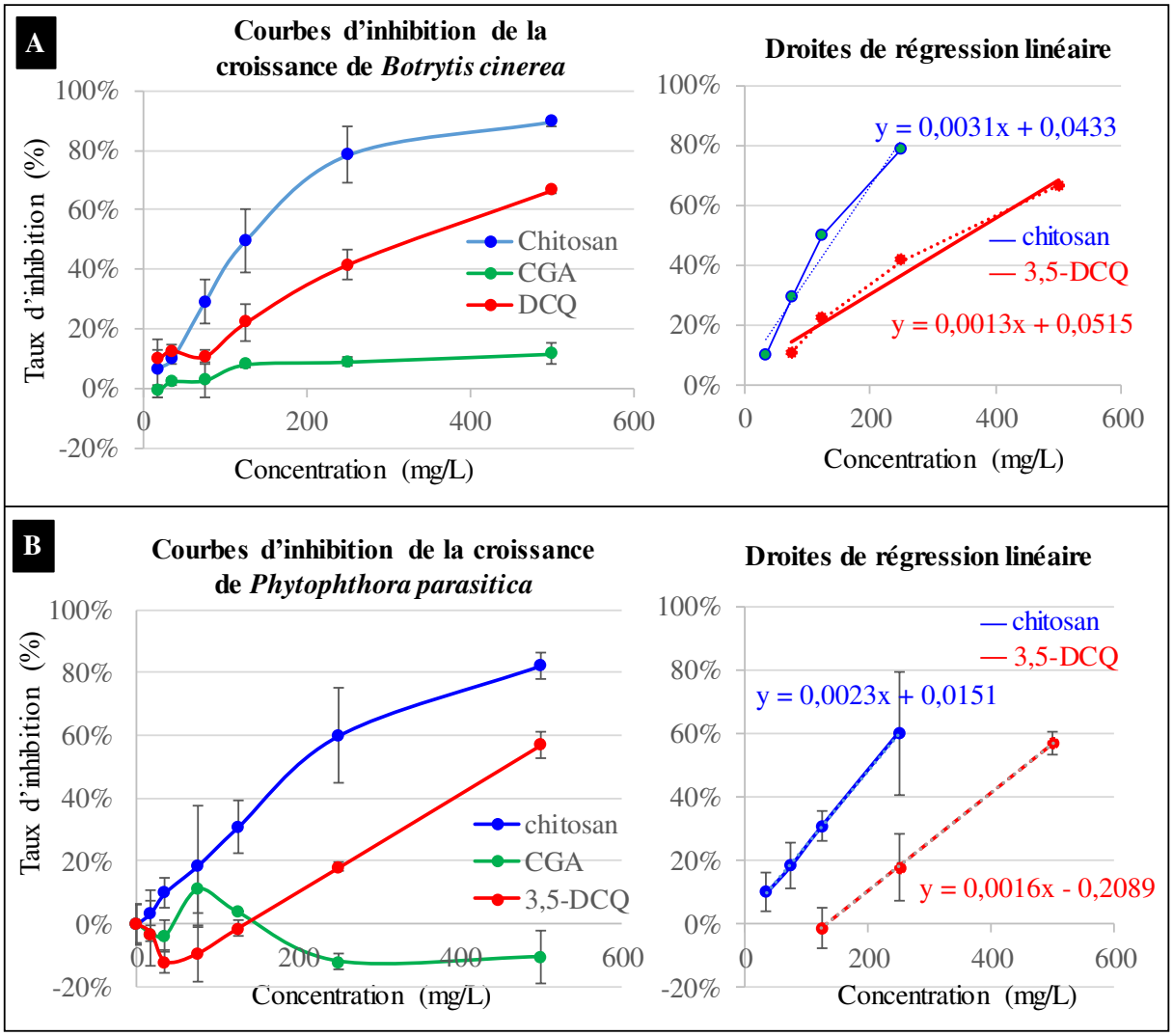


Figure 84 : Courbe d'inhibition de la croissance de Botrytis cinerea au bout de 5 jours d'incubation en présence des molécules tests. B : droites de régression linéaire et équations des droites utilisées pour déterminer la CE_{50} des molécules.

Par la suite, nous avons déterminé la CE_{50} (concentration efficace qui inhibe 50% la croissance du champignon) à l'aide d'une droite de régression tracée à partir de la courbe d'inhibition de chaque champignon (Figure 84a et b). Les équations des droites utilisées pour calculer la CE_{50} sont indiquées dans la Figure 84.

Sur le plan macroscopique, nous avons observé le développement du mycélium au bout de 5 jours pour *Botrytis cinerea* et 6 jours pour *Phytophthora parasitica* (Figure 85 et Figure 86). Nous constatons que le diamètre de croissance de *Botrytis cinerea* et *Phytophthora parasitica* diminue quand les concentrations en chitosan et 3,5-DCQ augmentent. Aucune réduction de la croissance fongique n'est cependant observée avec l'acide chlorogénique quelles que soient les concentrations (Figure 85 et Figure 86).

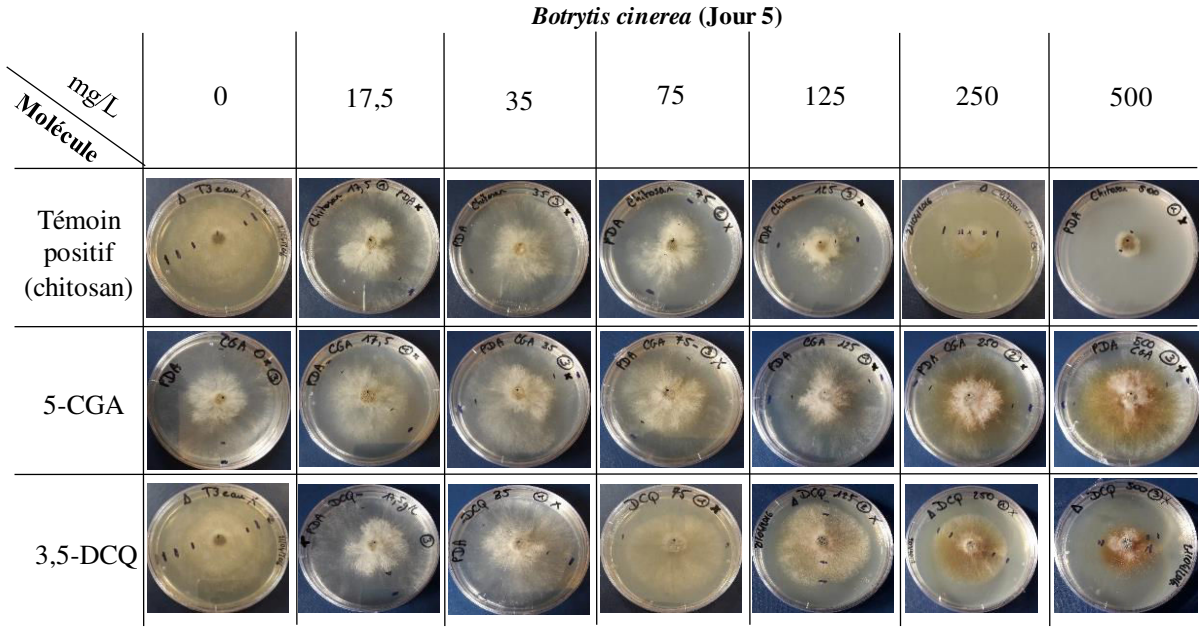


Figure 85 : Croissance des hyphes de Botrytis cinerea sur un milieu PDA additionné de la molécule à des concentrations croissantes (0/ 17,5/ 35/ 75/ 125/ 250/ 500mg/L). Les milieux ont été inoculés avec des disques d'agar de 6mm de diamètre prélevés d'une culture de champignon âgée de 10 jours. Photographies des boîtes après 5 jours d'incubation à l'obscurité à 20°C.

***Phytophthora parasitica* (Jour 6)**

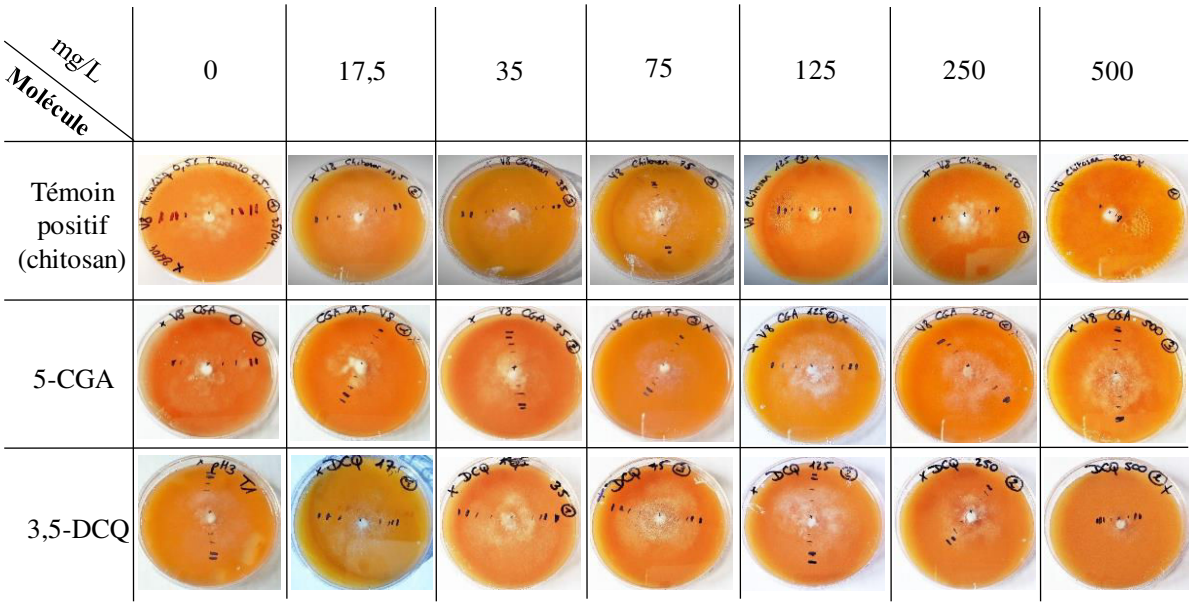


Figure 86 : Croissance des hyphes de Phytophthora parasitica sur un milieu V8 additionné de la molécule à des concentrations croissantes (0/ 17,5/ 35/ 75/ 125/ 250/ 500mg/L). Disques d'agar de 6mm de diamètre issus d'une culture de champignon âgée de 15 jours. Photographies des boîtes après 6 jours d'incubation à l'obscurité à 25°C.

Sur le plan quantitatif, nous avons évalué le taux d'inhibition en fonction de la concentration de la molécule étudiée (Figure 87). On remarque que le taux d'inhibition de *Botrytis cinerea* et de *Phytophthora parasitica* augmente avec les concentrations croissantes de chitosan et atteint un seuil de 90% au bout de 5 jours d'incubation pour *B. cinerea* et 6 jours pour *P. parasitica*. La concentration de chitosan qui réduit efficacement la croissance mycélienne de 50% (CE_{50}) est de 147mg/L pour *B. cinerea* et de 211mg/L pour *P. parasitica* (Figure 87a). Ces résultats sont cohérents avec deux études démontrant le rôle du chitosan dans la défense contre ces espèces fongiques (Reglinski *et al.*, 2010; Falcón-Rodríguez *et al.*, 2011). Concernant le 3,5-DCQ, on remarque que plus sa concentration augmente, plus l'effet inhibiteur sur les espèces fongiques est important. Sa CE_{50} est de 345mg/L pour *B. cinerea* et de 443mg/L pour *P. parasitica* (Figure 87c). En revanche, l'acide chlorogénique n'a aucun effet sur ces deux pathogènes (Figure 87b).

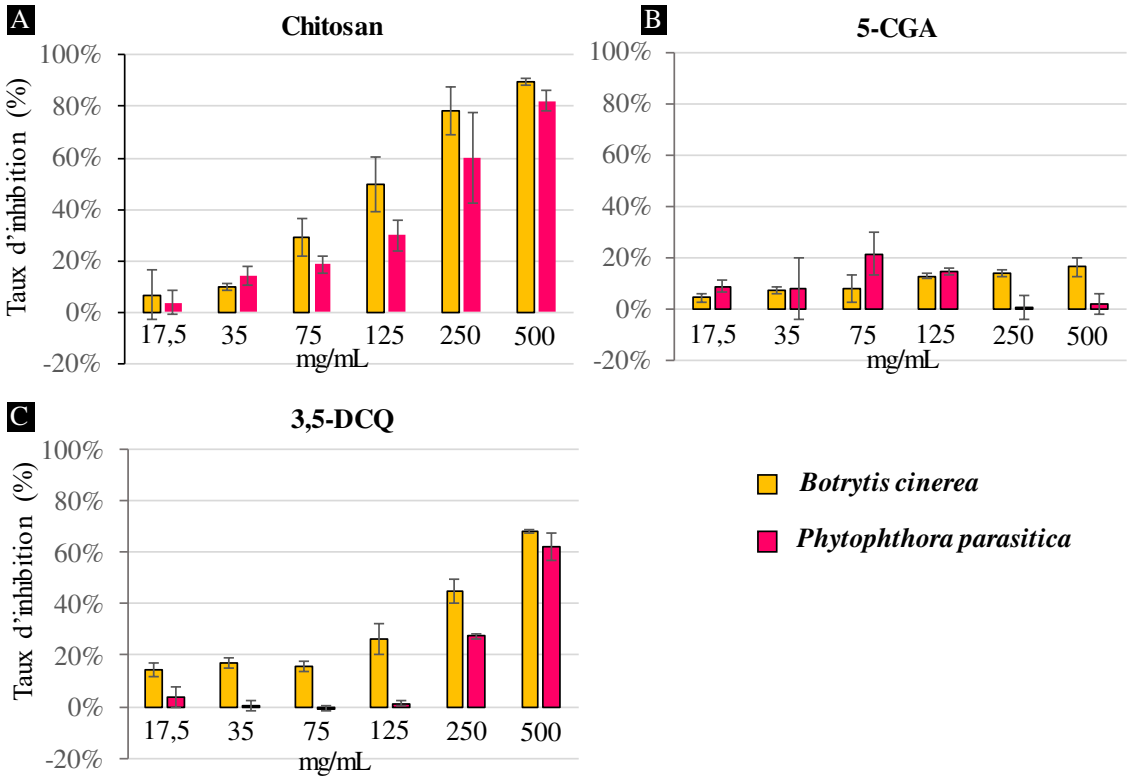


Figure 87 : Taux d'inhibition de la croissance fongique en fonction de la concentration de la molécule testée. Le chitosan est utilisé comme inhibiteur de référence. Le pourcentage d'inhibition est déterminé à partir du diamètre de l'hyphe en utilisant comme contrôle les témoins eau ajustés au pH des molécules.

Ce test nous a montré que le 3,5-DCQ est un agent inhibiteur des deux espèces fongiques étudiées alors que l'acide chlorogénique n'a aucun effet. Nous avons donc testé la résistance des tabacs transgéniques exprimant les HCT contre ces deux pathogènes.

3.6.2 Test d'infection de *Botrytis cinerea* sur feuilles détachées de plantes transgéniques

Afin d'étudier la résistance à des maladies fongiques, nous avons réalisé un test d'inoculation avec *Botrytis cinerea* sur feuilles détachées. Trois répétitions biologiques ont été réalisées en sélectionnant les trois plantes ayant la plus forte expression des gènes d'intérêt. Les inoculations ont été effectuées sur 5 feuilles par plante. Plusieurs témoins ont été préparés à partir d'une plante non transformée : 1) feuille blessée et non inoculée ; 2) feuille blessée inoculée avec le pathogène ; 4) feuille inoculée avec le pathogène + chitosan.

Afin de déterminer le pourcentage d'inhibition de la croissance, les feuilles ont été inoculées avec une concentration de $5{,}2.10^6$ spores/mL et incubées pendant 10 jours à 25°C sous photopériode contrôlée (16h de lumière/8h obscurité). Les dommages causés par *Botrytis cinerea* sont présentés dans la Figure 88. Au bout de 3 jours, la feuille issue d'une plante

sauvage présente une zone de nécrose au niveau du point d'inoculation et qui s'étend sur la moitié de la feuille au bout de 5 jours (Figure 88).

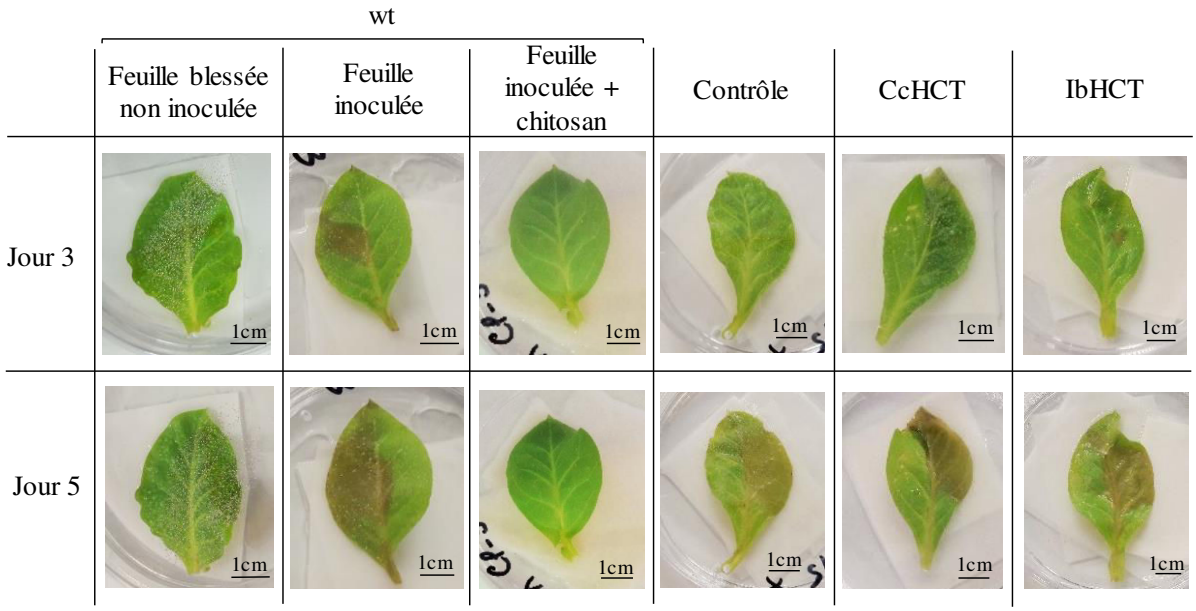


Figure 88 : Dommages causés par Botrytis cinerea sur les feuilles détachées de tabac. Les feuilles ont été inoculées avec 2µL d'une suspension de spores à 2,6.10^6 spores/mL. wt : plante sauvage non transformée. Ctrl : plante transformée avec le gène pNep2. IbHCT : plante transformée exprimant le gène codant l'HCT d'ipomée. CcHCT : plante transformée exprimant le gène codant l'HCT de café.

La feuille infectée en présence de chitosan ne présente aucun signe de nécrose, ce qui signifie que le chitosan confère bien la résistance au champignon. Concernant les plantes transgéniques contrôle et celles exprimant les HCT, les symptômes sont les mêmes que ceux de la plante sauvage, ce qui signifie qu'il n'y a eu aucune résistance à la maladie. Lorsqu'on regarde les teneurs en 3,5-DCQ dans les tissus (Figure 89), aucune différence n'est relevée entre les plantes transgéniques et les plantes contrôle et sauvage. Les teneurs sont d'environ 5mg/L ce qui est inférieur à la CE_{50} du 3,5-DCQ qui est de 345mg/L. Les teneurs en 3,5-DCQ dans la plante sont donc trop faibles pour qu'il y ait une réponse de défense contre ce pathogène.

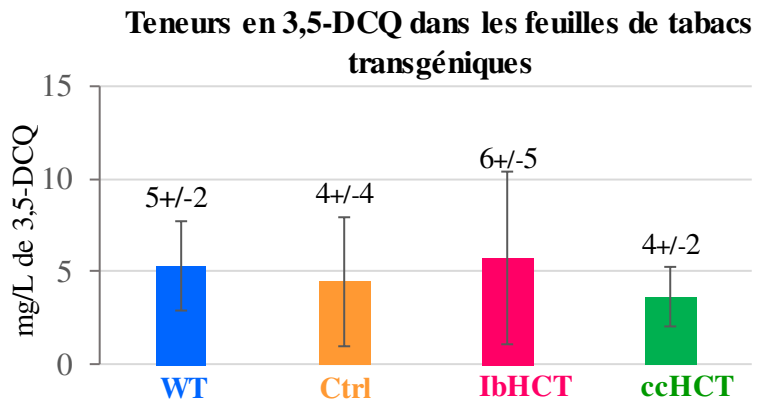


Figure 89 : Teneurs en 3,5-DCQ dans les feuilles des tabacs utilisés pour le test d'infection avec Botrytis cinerea. 3 répétitions biologiques ont été réalisées en sélectionnant les 3 plantes ayant la plus forte expression du gène d'intérêt. 5 feuilles par plante ont été analysées. wt : plante sauvage non transformée. Ctrl : plante transformée avec le gène pNep2. IbHCT : plante transformée exprimant le gène codant l'HCT d'ipomée. CcHCT : plante transformée exprimant le gène codant l'HCT de café.

Puisque les feuilles sont trop pauvres en 3,5-DCQ, l'autre solution aurait été de concentrer le 3,5-DCQ à partir de plusieurs feuilles rassemblées en un seul extrait. Ces extraits pourraient être déposés sur une gélose en présence des champignons et nous aurions pu procéder de la même façon que le test sur les molécules pures (cf δ 3.6.1).

3.6.3 Conclusion relative aux tests anti-fongiques sur les tabacs exprimant les HCT

Dans cette quatrième partie, nous avons testé la résistance des plantes transgéniques exprimant les HCT contre *Botrytis cinerea*. Ce champignon est responsable de la pourriture grise en particulier chez la vigne, mais il peut également infecter un large spectre d'hôtes (Elad *et al*., 1994). C'est un pathogène nécrotrophe, c'est-à-dire qu'il induit la senescence des tissus et consomme son hôte une fois mort (Swartzberg *et al*., 2008). Pour étudier l'effet des molécules sur le développement du champignon, nous avons incorporé les molécules dans les milieux inoculés avec le champignon. Nous avons vu que la croissance de l'hyphe est inhibée par le 3,5-DCQ dont la CE_{50} est de 345mg/L, alors que l'acide chlorogénique n'induit aucun effet. Des résultats similaires ont été rapportés sur l'action d'autres isomères de DCQ sur ce champignon (Chen *et al*., 2013).

Comme l'HCT joue un rôle dans la synthèse de DCQ ou d'autres molécules, nous avons étudié la résistance à ce pathogène sur des tabacs transgéniques exprimant les HCT. Le test d'inoculation a été réalisé sur des feuilles détachées. Cinq jours après inoculation, les feuilles des plantes exprimant les HCT étaient aussi sensibles à l'infection que les feuilles témoin. Notons que la teneur en 3,5-DCQ dans ces tissus était très faible (5mg/L). Or la concentration de la molécule nécessaire pour inhiber de 50% le champignon est de 345mg/L. Les plantes ne produisaient donc pas assez de 3,5-DCQ pour exercer une résistance contre ce pathogène.

En parallèle, nous avons testé l'effet de l'acide chlorogénique et du 3,5-DCQ sur la croissance de *Phytophthora parasitica*. Ce phytopathogène du sol a la particularité d'infecter les racines, mais peut provoquer des symptômes au niveau de la tige et des feuilles. Ce parasite est capable d'infecter un large spectre de plantes hôtes en particulier les Solanacées comme le tabac, la tomate et la pomme de terre (Benson, 1997; Attard *et al*., 2008; Meng *et al*., 2014). Ce test a montré que seul le 3,5-DCQ inhibait la croissance de *P. parasitica* avec une CE_{50} de 443mg/L, bien que son efficacité soit inférieure à celle du chitosan dont la CE_{50} est de 211mg/L. Compte tenu de la teneur mesurée dans les feuilles, les plantes transgéniques ne produisent pas assez de 3,5-DCQ pour être résistantes à ce pathogène.

Ainsi le 3,5-DCQ exerce un effet négatif sur la croissance des deux pathogènes testés. Son activité pourrait être augmentée en présence d'autres composés comme cela a été démontré sur l'activité anti-microbienne synergique du chitosan avec des huiles essentielles (Wang *et al*., 2011).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'entreprise PAT emploie une technique d'extraction végétale appelée « PAT Plantes à traire® » pour produire des extraits végétaux. L'un des produits phare est l'extrait d'*Ipomoea batatas* dont la molécule active est l'acide 3,5-dicaféoyl-quinique (3,5-DCQ) dotée de fortes propriétés antioxydantes. Cette molécule est naturellement produite en grande quantité dans cette plante. En parallèle à cette technologie, PAT développe une méthode alternative à l'extraction végétale, l'ingénierie métabolique, en vue d'obtenir des niveaux de production plus élevés que dans la plante d'origine. Dans le cadre de ce travail, notre étude avait pour objectif d'identifier la voie de biosynthèse du 3,5-DCQ dans cette plante et de l'exploiter par des approches d'ingénierie métabolique en vue d'augmenter la production de la molécule d'intérêt.

Ces travaux de thèse ont abouti à l'identification d'un gène codant une hydroxycinnamoyl transférase (HCT) impliquée dans la synthèse de 3,5-DCQ. Ils faisaient suite aux travaux de Dr Barbara Menin qui avait sélectionné 13 gènes candidats par comparaison des séquences avec des HCTs impliquées dans la synthèse d'acides caféoyl-quiniques.

En première partie de ce travail, nous avons élaboré une classification phylogénétique par homologie de séquence peptidique avec des acyltransférases de la famille des BAHD caractérisées fonctionnellement. Nous avons ainsi mis en évidence une HCT et une HQT d'ipomée qui ont une forte homologie avec d'autres HCT et HQT déjà caractérisées dans la synthèse des dérivés d'acide caféoyl-quinique. Nous avons ensuite étudié l'expression différentielle de ces gènes candidats afin de mettre en évidence une corrélation entre l'expression de ces gènes et la synthèse de 3,5-DCQ. Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions optimales de culture pour sélectionner les plantes à forte teneur en 3,5-DCQ dans les racines d'ipomée. Nous avons observé que les plantes cultivées en condition d'azote limitant atteignaient une teneur en 3,5-DCQ maximale dès 14 jours de culture. Cette teneur varie de 1,5% à 8% de 3,5-DCQ et cette variation est liée aux changements des saisons. Dans un deuxième temps, nous avons classé les gènes par rapport à leur expression différentielle entre des plantes surproductrices et faiblement productrices de 3,5-DCQ. Parmi les gènes candidats, nous avons observé que le gène *IbHCT* était deux fois plus exprimé dans les plantes surproductrices de 3,5-DCQ. Etant donné que c'est la première protéine candidate vis-à-vis de son homologie de séquence avec les autres HCTs caractérisées dans la synthèse des dérivés d'acide caféoylquiniques, notre travail s'est axé en priorité sur le clonage et la caractérisation de l'HCT d'ipomée.

En seconde partie de ce travail, nous avons réalisé l'expression hétérologue de l'HCT d'ipomée chez *E. coli*. Cette bactérie est souvent utilisée comme modèle pour la reconstitution et l'ingénierie du métabolisme secondaire (Baneyx, 1999). Du fait de sa croissance rapide et de sa facilité de transformation, ce système nous a permis d'exprimer et de caractériser fonctionnellement la protéine *in vitro*. Un premier test d'incubation réalisé sur un extrait brut contenant l'HCT d'ipomée a montré que l'enzyme recombinante est capable de catalyser *in*

vitro la formation d'acide chlorogénique à partir de caféoyl-CoA et d'acide quinique et la synthèse de 3,5-DCQ à partir d'acide chlorogénique.

Afin d'optimiser les conditions de réaction et la production des molécules, nous avons mis au point un protocole de purification et de concentration de la protéine. Le système Ni-NTA en batch couplé à un dessalage et une reconcentration sur colonne Centricon de 10 kDa s'est avéré être la meilleure méthode permettant de concentrer jusqu'à 2 fois la protéine et d'obtenir une concentration de 60mg/mL de protéine purifiée. Ainsi en travaillant sur les paramètres d'optimisation de la réaction, nous avons montré qu'une incubation de l'HCT purifiée à une concentration de 15mg/mL permet de synthétiser 0,42mg/L d'acide chlorogénique à pH7 et 0,15mg/L de 3,5-DCQ à pH6 en 1h d'incubation. Cependant la réaction de synthèse du DCQ est très longue puisqu'elle évolue encore après 15h d'incubation. Cette durée de réaction est du même ordre de grandeur dans le cas des HCT de café et de tomate (Comino *et al*., 2007; Lallemand *et al*., 2012; Moglia *et al*., 2014). C'est pourquoi, ce facteur est très limitant pour déterminer les paramètres cinétiques (Vm, Km). Afin d'améliorer l'activité de synthèse de DCQ, on pourrait modifier la séquence protéique par des approches de mutagénèse dirigée ou aléatoire afin d'identifier les sites actifs de l'enzyme.

Afin d'étudier les autres fonctions de l'HCT d'ipomée, nous avons testé un panel d'esters de CoA comme substrats. Difficilement disponibles sur le marché, nous les avons produits en utilisant une méthode de production par voie enzymatique avec une 4-hydroxycinnamoyl CoA ligase (4CL) de tabac. En s'appuyant sur un protocole déjà publié, nous avons modifié plusieurs paramètres de réaction afin d'obtenir la quantité requise pour les tests d'incubation avec l'HCT recombinante. En augmentant les concentrations des réactifs et en prolongeant la durée de la réaction, nous avons pu augmenter les concentrations des produits. Les esters de CoA ont été identifiés par HPLC et quantifiés par spectrophotométrie. Certains esters de CoA comme le féruloyl-CoA sont faiblement produits avec l'enzyme utilisée, mais on pourrait travailler avec d'autres 4CL issues d'espèces différentes qui présentent des affinités plus grandes pour certains substrats, ce qui augmenterait la synthèse d'un produit plutôt qu'un autre.

Différentes combinaisons de substrats ont été testées et incubées en présence de l'enzyme et les produits ont été identifiés en LC-MS. Nous avons montré que l'HCT d'ipomée est capable de synthétiser *in vitro* du caféoyl-quinate, du caféoyl-shikimate, du *p*-coumaroyl-quinate et du *p*-coumaroyl-shikimate tout comme d'autres HCTs (Hoffmann *et al*., 2003; Niggeweg *et al*., 2004). Elle est également capable d'accepter le cinnamoyl-CoA comme donneur d'acyl avec soit du quinate soit du shikimate pour donner respectivement du cinnamoyl-quinate et du cinnamoyl-shikimate. Aucun produit n'a été par contre détecté à partir du féruloyl-CoA. Ce substrat n'est pas efficacement pris en charge par cette enzyme (Hoffmann *et al*., 2003), mais est le substrat privilégié d'une cinnamoyl-CoA réductase impliquée dans la synthèse des monolignols (Hoffmann *et al*., 2003).

La troisième partie de cette thèse avait pour finalité deux objectifs : d'une part confirmer l'activité de synthèse de 3,5-DCQ par l'HCT *in planta* et d'autres parts obtenir des plantes surproductrices de 3,5-DCQ et tester la résistance à des maladies fongiques pour des

potentielles applications agronomiques. Nous avons abordé cette étude par une approche de transgénèse sur du tabac d'après un protocole de transformation connu (Gallois et Marinho, 1995). Nous avons généré des plantes transgéniques qui expriment les HCT de café et d'ipomée. En regardant le profil phytochimique de ces plantes, aucune différence de teneur en métabolites cibles (acide chlorogénique et 3,5-DCQ) n'a été notée par rapport aux plantes contrôle. Le fait que l'HCT d'ipomée utilise un large éventail de substrats pourrait expliquer qu'elle est affiliée à d'autre fonctions plus importantes et qu'elle joue un rôle secondaire dans la synthèse de 3,5-DCQ. Malgré les répétitions biologiques, les plantes montraient des teneurs très différentes. Ces différences peuvent résulter de la remobilisation des susbtrats vers d'autres voies métaboliques, ce qui limite la disponibilité des précurseurs du 3,5-DCQ. Des études de flux métabolique par des approches de radiomarquage pourraient permettre de suivre le devenir de ces molécules dans la plante. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette variabilité comme l'âge de la feuille ou bien le substrat endogène en quantité limitante.

Deux stratégies ont été mises en place pour s'affranchir de ces problèmes :

- l'incubation des feuilles de tabac en présence d'acide chlorogénique. Cette méthode nous a permis de montrer que la teneur en 3,5-DCQ avait augmenté d'un facteur 2 pour *CcHCT* (1,27mg/L) et d'un facteur 3 pour *IbHCT* (1,93mg/L) par rapport au contrôle ; Cette augmentation n'était significative qu'en approvisionnant les cellules avec de l'acide chlorogénique exogène, ce qui suggère que la production de 3,5-DCQ est dépendante de la disponibilité du substrat. Etant donné que les plantes exprimant les HCT ont des teneurs en 3,5-DCQ très variables, cela peut être dû à la quantité de substrat limitante. L'acide chlorogénique est le précurseur de nombreuses voies métaboliques comme la voie de biosynthèse de la lignine. Pour que l'acide chlorogénique soit uniquement mobilisé vers la synthèse de 3,5-DCQ, nous pourrions réaliser la suppression des voies consommatrices du même substrat utilisé par l'HCT, sans qu'il n'y ait de répercussion sur le développement ou le fonctionnnement de la plante.

- l'ajout d'acide chlorogénique dans des cultures cellulaires exprimant les HCT. Cette technique permet également de contourner les problèmes d'hétérogénéité tissulaire. Au préalable, nous nous sommes assurés que l'acide chlorogénique n'inhibait pas la croissance cellulaire. En parallèle, nous avons testé la production des métabolites d'intérêt en situation de carence azotée. L'absence d'azote n'inhibe pas la croissance des cellules, mais elle semble favoriser l'exsudation des molécules d'intérêt (acide chlorogénique et 3,5-DCQ) que l'on retrouve dans le milieu. Nous avons observé que les cellules exprimant les HCTs produisent plus d'acide chlorogénique et de 3,5-DCQ que les plantes contrôle. La meilleure teneur en 3,5-DCQ obtenue est de 0,03% (MS) pour l'HCT de café et de 0,01% (MS) pour l'HCT d'ipomée. La déprivation en azote ne permet pas d'augmenter la production des métabolites, mais l'ajout d'acide chlorogénique dans le milieu semble favoriser la production de 3,5-DCQ. Néanmoins les niveaux de production sont loin d'être à la hauteur de ce qui est obtenu chez la plante d'origine (entre 0,5 et 9% de MS dans les racines d'ipomée). Cela sous-entend que d'autres voies plus importantes seraient impliquées comme celle des esters de coumaroyl-CoA. Sachant que l'HCT d'ipomée utilise divers substrats, il serait intéressant d'identifier les autres produits qu'elle pourrait synthétiser en priorité.

Etant donné que les concentrations en 3,5-DCQ obtenues *in vitro* sont très faibles et que l'HCT présente différentes spécificités de substrats, l'activité de synthèse de 3,5-DCQ n'est sans doute pas la fonction principale de l'enzyme. Afin d'améliorer la synthèse de 3,5-DCQ, nous pourrions nous pencher sur d'autres méthodes comme l'utilisation de facteurs de transcription pouvant activer des voies de biosynthèse cibles. Cette stratégie s'est avérée déjà fructueuse comme l'ont démontré Tuan *et al*., 2014. Leurs travaux ont montré que l'expression du facteur PAP1 d'*Arabidopsis thaliana* augmentait de presque 10 fois la production d'acide chlorogénique dans des cultures de hairy roots de *Platicodon grandifolium,* la concentration pouvant atteindre 421,31µg/100mg de matière sèche par rapport aux cultures control (42,60 µg/100mg). Cela offre une possibilité pour de futures investigations.

En quatrième partie de ce travail, nous avons réalisé des tests d'infection fongique pour des potentielles applications agronomiques liées à la défense des végétaux. Etant donné que les HCT synthétisent du DCQ et de l'acide chlorogénique, nous avons testé l'effet de ces molécules sur des pathogènes fongiques causant des maladies sur les grandes cultures. Le test met en évidence l'effet inhibiteur du 3,5-DCQ sur les deux espèces étudiées *Botrytis cinerea* et *Phytophthora parasitica*. Après inoculation des spores fongiques sur des feuilles de plantes transgéniques qui expriment des HCT, nous n'avons pas relevé de signe de résistance car la teneur en 3,5-DCQ était trop faible par rapport à la CE_{50} de la molécule. Cette approche pourrait être une solution de lutte biologique en trouvant d'autres gènes que les HCT capables d'augmenter la production de 3,5-DCQ dans les plantes à des teneurs minimum de 345mg/L de 3,5-DCQ pour inhiber de 50% la croissance de *Botrytis cinerea*.

En perspectives de ce travail, nous nous focaliserons sur la recherche d'autres gènes compte tenu du fait que l'HCT n'explique pas la teneur totale dans la plante. En plus des autres gènes candidats qu'il reste à caractériser, il serait intéressant de rechercher d'autres gènes en dehors de la famille des transférases. Récemment, une fraction protéique d'un extrait racinaire de patate douce renfermant une activité de synthèse de 3,5-DCQ a été purifiée (comme Villegas et Kojima, 1986). L'analyse par des approches de MS/MS a permis de mettre en évidence des peptides dont certains appartiennent à une lipase (Legrand, thèse 2015). Depuis peu, des auteurs soulignent l'existence d'une nouvelle famille d'enzymes appelées « SCPL » pour acyltransférases de type Serine Carboxy Peptidase (Bontpart *et al*., 2015). Les premières investigations, débutées en 1972, décrivent une de ces enzymes comme étant capable de synthétiser du CGA par trans-acylation d'un ester de glucose (Kojima et Uritani, 1972). Cela nous oriente vers de nouvelles pistes de recherches.

D'autres stratégies permettant d'améliorer la production des métabolites consistent à co-exprimer plusieurs gènes et à éteindre d'autres voies limitantes. Par exemple, la co-expression des gènes *HCT* et *HQT* avec le gène *4CL* chez des mutants de la voie du shikimate a permis d'augmenter la production d'acide chlorogénique qui est ainsi passée de 16 à 450 mg/L dans des cultures d'*E. coli* (Kim *et al*., 2013). On peut également travailler sur l'optimisation de

paramètres physiques et temporels dans des cultures bactériennes (Rosano et Ceccarelli, 2014) ou bien sur l'ajout d'éliciteurs biotiques et abiotiques et l'ajout d'hormones dans le milieu pour les cultures cellulaires végétales (Roberts et Shuler, 1997). Il serait également intéressant de déterminer les paramètres cinétiques de l'HCT d'ipomée afin de pouvoir comparer son efficacité par rapport à d'autres HCT décrites dans la littérature (Niggeweg *et al*., 2004; Lallemand *et al*., 2012). La caractérisation de l'HCT pourrait être poursuivie par des études structurales en créant des mutations dans la séquence protéique. La mutagénèse dirigée permettrait de cibler des acides aminés à des endroits précis afin d'identifier les sites actifs critiques pour le contrôle des activités enzymatiques.

En plus des diesters d'acide caféoyl-quinique, la plante produit également des triesters comme le 3,4,5-TCQ possédant des activités très intéressantes dans le domaine thérapeutique. Il s'agit cependant de molécules rares car elles sont produites chez très peu d'espèces végétales et à des teneurs infimes dans les plantes en question. L'idée serait donc d'isoler le gène d'intérêt pour accroitre la production de ces métabolites soit par transgénèse végétale soit par culture cellulaire ou tissulaire ou encore dans des micro-organismes modifiés par des approches d'ingénierie métabolique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A., and Bessis, R. (1997). Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against Botrytis cinerea, the causal agent for gray mold. J. Chem. Ecol. *23*, 1689–1702.

Adzet, T., and Puigmacia, M. (1985). High-Performance Liquid-Chromatography of Caffeoylquinic Acid-Derivatives of Cynara-Scolymus L Leaves. J. Chromatogr. *348*, 447–453.

Aerts, R.J., and Baumann, T.W. (1994). Distribution and utilization of chlorogenic acid in Coffea seedlings. J. Exp. Bot. *45*, 497–503.

Ågren, G.I., and Franklin, O. (2003). Root : Shoot Ratios, Optimization and Nitrogen Productivity. Ann. Bot. *92*, 795–800.

Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., Sun, Z.K., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blaas, J., van Houwelingen, A., De Vos, R.C.H., van der Voet, H., *et al*. (2000). Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. Plant Cell *12*, 647–661.

Amiot, M., Aubert, S., and Nicolas, J. (1992). Phenolic Composition and Browning Susceptibility of Various Apple and Pear Cultivars at Maturity. In International Symposium on the Physiological Basis of Postharvest Technologies, M.E. Saltveit, ed. (Wageningen: Int Soc Horticultural Science), pp. 67–69.

Arif, T. (2015). Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. *8*, 455–461.

Armesto, N., Ferrero, M., Fernández, S., and Gotor, V. (2003). Novel enzymatic synthesis of 4-O-cinnamoyl quinic and shikimic acid derivatives. J. Org. Chem. *68*, 5784–5787.

Armstrong, G.M., Rohrbaugh, L.M., Rice, E.L., and Wender, S.H. (1970). The effect of nitrogen deficiency on the concentration of caffeoylquinic acids and scopolin in tobacco. Phytochemistry *9*, 945–948.

Attard, A., Gourgues, M., Galiana, E., Panabieres, F., Ponchet, M., and Keller, H. (2008). Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for Phytophthora parasitica Dastur (syn. P. Nicotianae Breda de Haan). J. Plant Physiol. *165*, 83–94.

Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. *99*, 191–203.

Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr. Opin. Biotechnol. *10*, 411–421.

Baucher, M., Bernard-Vailhe, M.A., Chabbert, B., Besle, J.M., Opsomer, C., Van Montagu, M., and Botterman, J. (1999). Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (Medicago sativa L.) and the effect on lignin composition and digestibility. Plant Mol. Biol. *39*, 437–447.

Bauer, V.R., Jurcic, K., Puhlmann, J., and Wagner, H. (1988). Immunologic in vivo and in vitro studies on Echinacea extracts. Arzneimittelforschung. *38*, 276–281.

Bayer, A., Ma, X.Y., and Stockigt, J. (2004). Acetyltransfer in natural product biosynthesis - functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. Bioorg. Med. Chem. *12*, 2787–2795.

Bellail, A.A. (2012). Effect of Home-Cooking Methods on Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Sweetpotato (Ipomoea batatas (L.) Lam.) Cultivars Grown in Egypt. Food Nutr. Sci. *3*, 490–499.

Benedito, V.A., and Modolo, L.V. (2014). Introduction to metabolic genetic engineering for the production of valuable secondary metabolites in in vivo and in vitro plant systems. Recent Pat. Biotechnol. *8*, 61–75.

Beninger, C.W., Abou-Zaid, M.M., Kistner, A.L.E., Hallett, R.H., Iqbal, M.J., Grodzinski, B., and Hall, J.C. (2004). A Flavanone and Two Phenolic Acids from Chrysanthemum morifolium with Phytotoxic and Insect Growth Regulating Activity. J. Chem. Ecol. *30*, 589–606.

Benson, D.M. (1997). Phytophthora diseases worldwide. Crop Prot. *16*, 399.

Beuerle, T., and Pichersky, E. (2002). Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme a esters. Anal. Biochem. *302*, 305–312.

Bhattacharya, A., Sood, P., and Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. Mol. Plant Pathol. *11*, 705–719.

Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. Annu. Rev. Plant Biol. *54*, 519–546.

Bontpart, T., Cheynier, V., Ageorges, A., and Terrier, N. (2015). BAHD or SCPL acyltransferase? What a dilemma for acylation in the world of plant phenolic compounds. New Phytol. *208*, 695–707.

Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., and Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Phytochem. Rev. *5*, 293–308.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. *56*, 317–333.

Burhenne, K., Kristensen, B.K., and Rasmussen, S.K. (2003a). A New Class of N-Hydroxycinnamoyl transferases Purification, Cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyl transferase (EC 2.3.1.64). J. Biol. Chem. *278*, 13919–13927.

Caffieri, S., Zarebska, Z., and Dall'Acqua, F. (1996). Psoralen photosensitization: damages to nucleic acid and membrane lipid components. Acta Biochim. Pol. *43*, 241–246.

Campa, C., Noirot, M., Bourgeois, M., Pervent, M., Ky, C.L., Chrestin, H., Hamon, S., and de Kochko, A. (2003). Genetic mapping of a caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase gene in

coffee trees. Impact on chlorogenic acid content. TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet. *107*, 751–756.

Cao, X., Xiao, H., Zhang, Y., Zou, L., Chu, Y., and Chu, X. (2010). 1, 5-Dicaffeoylquinic acid-mediated glutathione synthesis through activation of Nrf2 protects against OGD/reperfusion-induced oxidative stress in astrocytes. Brain Res. *1347*, 142–148.

Carstens, M., Vivier, M.A., and Pretorius, I.S. (2003). The Saccharomyces cerevisiae chitinase, encoded by the CTS1-2 gene, confers antifungal activity against Botrytis cinerea to transgenic tobacco. Transgenic Res. *12*, 497–508.

Casadaban, M.J., and Cohen, S.N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. J. Mol. Biol. *138*, 179–207.

Castillo, J., Gáspár, S., Sakharov, I., and Csöregi, E. (2003). Bienzyme biosensors for glucose, ethanol and putrescine built on oxidase and sweet potato peroxidase. Biosens. Bioelectron. *18*, 705–714.

Chanforan, C., Loonis, M., Mora, N., Caris-Veyrat, C., and Dufour, C. (2012). The impact of industrial processing on health-beneficial tomato microconstituents. Food Chem. *134*, 1786–1795.

Chang, A., Lim, M.-H., Lee, S.-W., Robb, E.J., and Nazar, R.N. (2008). Tomato phenylalanine ammonia-lyase gene family, highly redundant but strongly underutilized. J. Biol. Chem. *283*, 33591–33601.

Chang, Y.-H., Yan, H.-Z., and Liou, R.-F. (2015). A novel elicitor protein from Phytophthora parasitica induces plant basal immunity and systemic acquired resistance. Mol. Plant Pathol. *16*, 123–136.

Chen, F., Long, X., Yu, M., Liu, Z., Liu, L., and Shao, H. (2013). Phenolics and antifungal activities analysis in industrial crop Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) leaves. Ind. Crops Prod. *47*, 339–345.

Chen, S., Liu, J., Gong, H., and Yang, D. (2009). Identification and antibacterial activity of secondary metabolites from Taxus endophytic fungus. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao Chin. J. Biotechnol. *25*, 368–374.

Chen, Z., Tang, N., You, Y., Lan, J., Liu, Y., and Li, Z. (2015). Transcriptome Analysis Reveals the Mechanism Underlying the Production of a High Quantity of Chlorogenic Acid in Young Leaves of Lonicera macranthoides Hand.-Mazz. Plos One *10*, e0137212.

Cheng, S.-Y., Xu, F., and Wang, Y. (2009). Advances in the study of flavonoids in Ginkgo biloba leaves. J. Med. Plants Res. *3*, 1248–1252.

Chishaki, N., and Horiguchi, T. (1997). Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency (Reprinted from Plant nutrition for sustainable food production and environment, 1997). Soil Sci. Plant Nutr. *43*, 987–991.

Cipollini, D., Stevenson, R., Enright, S., Eyles, A., and Bonello, P. (2008a). Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, Lonicera maackii, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects. J. Chem. Ecol. *34*, 144–152.

Clifford, M.N. (2000). Chlorogenic Acids and Other Cinnamates—Nature, Occurrence, Dietary Burden, Absorption and Metabolism. J. Sci. Food Agric. - J SCI FOOD AGR *80*, 1033–1043.

Clifford, M.N., Kellard, B., and Birch, G.G. (1989). Characterisation of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. Food Chem. *33*, 115–123.

Clifford, M.N., Knight, S., and Kuhnert, N. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS(n). J. Agric. Food Chem. *53*, 3821–3832.

Cochrane, F.C., Davin, L.B., and Lewis, N.G. (2004). The Arabidopsis phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. Phytochemistry *65*, 1557–1564.

Comino, C., Lanteri, S., Portis, E., Acquadro, A., Romani, A., Hehn, A., Larbat, R., and Bourgaud, F. (2007). Isolation and functional characterization of a cDNA coding a hydroxycinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in Cynara cardunculus L. BMC Plant Biol. *7*, 14.

Comino, C., Hehn, A., Moglia, A., Menin, B., Bourgaud, F., Lanteri, S., and Portis, E. (2009). The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. Bmc Plant Biol. *9*, 30.

Correa, A., and Oppezzo, P. (2015). Overcoming the solubility problem in E. coli: available approaches for recombinant protein production. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1258*, 27–44.

Costa, M.A., Bedgar, D.L., Moinuddin, S.G.A., Kim, K.-W., Cardenas, C.L., Cochrane, F.C., Shockey, J.M., Helms, G.L., Amakura, Y., Takahashi, H., *et al*. (2005). Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in Arabidopsis: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation. Phytochemistry *66*, 2072–2091.

Costa, S.J., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L., and Besir, H. (2013). The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in Escherichia coli: a comparison with the traditional gene fusion technology. Appl. Microbiol. Biotechnol. *97*, 6779–6791.

Costaglioli, P., Joubes, K., Garcia, C., Stef, M., Arveiler, B., Lessire, R., and Garbay, B. (2005). Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in Arabidopsis thaliana by microarray analysis. Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids *1734*, 247–258.

Croteau R., Kutchan T.M; Lewis N.W (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants-Natural Products (Secondary metabolites)-Chapter 24.

Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.-R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. Plant Physiol. *139*, 5–17.

Dan, Y., Liu, H.-Y., Gao, W.-W., and Chen, S.-L. (2010). Activities of essential oils from Asarum heterotropoides var. mandshuricum against five phytopathogens. Crop Prot. *29*, 295–299.

D'Auria, J.C. (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. Curr. Opin. Plant Biol. *9*, 331–340.

D'Auria, J.C., Chen, F., and Pichersky, E. (2002a). Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of Clarkia breweri. Plant Physiol. *130*, 466–476.

Dawidowicz, A.L., and Typek, R. (2010). Thermal stability of 5-o-caffeoylquinic acid in aqueous solutions at different heating conditions. J. Agric. Food Chem. *58*, 12578–12584.

Dixon, R.A., and Paiva, N.L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. Plant Cell *7*, 1085–1097.

Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D., and Parvathi, K. (2001). The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? Phytochemistry *57*, 1069–1084.

Dogan, S., Dogan, M., and Arslan, O. (2009). Enzymatic Browning in Foods and Its Prevention (Hauppauge: Nova Science Publishers, Inc).

Duarte, G.S., Pereira, A.A., and Farah, A. (2010). Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. Food Chem. *118*, 851–855.

Dudareva, N., D'Auria, J.C., Nam, K.H., Raguso, R.A., and Pichersky, E. (1998). Acetyl-CoA : benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in Clarkia breweri. Plant J. *14*, 297–304.

Duke, S.O., Baerson, S.R., Dayan, F.E., Rimando, A.M., Scheffler, B.E., Tellez, M.R., Wedge, D.E., Schrader, K.K., Akey, D.H., Arthur, F.H., *et al*. (2003). United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service research on natural products for pest management. Pest Manag. Sci. *59*, 708–717.

Ehlting, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E., and Kombrink, E. (1999). Three 4-coumarate : coenzyme A ligases in Arabidopsis thaliana represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. Plant J. *19*, 9–20.

Eich, E. (2008). Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites: Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook) (Springer Science & Business Media).

Elad, Y., Kohl, J., and Fokkema, N. (1994). Control of Infection and Sporulation of Botrytis-Cinerea on Bean and Tomato by Saprophytic Yeasts. Phytopathology *84*, 1193–1200.

Erba, D., Casiraghi, M.C., Ribas-Agustí, A., Cáceres, R., Marfà, O., and Castellari, M. (2013). Nutritional value of tomatoes (Solanum lycopersicum L.) grown in greenhouse by different agronomic techniques. J. Food Compos. Anal. *31*, 245–251.

Falcón-Rodríguez, A.B., Costales, D., Cabrera, J.C., and Martínez-Téllez, M.Á. (2011). Chitosan physico–chemical properties modulate defense responses and resistance in tobacco plants against the oomycete Phytophthora nicotianae. Pestic. Biochem. Physiol. *100*, 221–228.

Faulds, C.B., and Williamson, G. (1999). The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. J. Sci. Food Agric. *79*, 393–395.

Friedman, M., and Jurgens, H.S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. *48*, 2101–2110.

Fritsche, J., Beindorff, C.M., Dachtler, M., Zhang, H., and Lammers, J.G. (2002). Isolation, characterization and determination of minor artichoke (Cynara scolymus L.) leaf extract compounds. Eur. Food Res. Technol. *215*, 149–157.

Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., and Stitt, M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. Plant J. *46*, 533–548.

Fujiwara, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Nakao, M., Ashikari, T., and Kusumi, T. (1997). Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from Gentiana triflora. Purification, characterization and its role in anthocyanin biosynthesis. Eur. J. Biochem. FEBS *249*, 45–51.

Fujiwara, H., Tanaka, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Nakao, M., Fukui, Y., Yamaguchi, M., Ashikari, T., and Kusumi, T. (1998). cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from Gentiana triflora. Plant J. *16*, 421–431.

Galieni, A., Di Mattia, C., De Gregorio, M., Speca, S., Mastrocola, D., Pisante, M., and Stagnari, F. (2015). Effects of nutrient deficiency and abiotic environmental stresses on yield, phenolic compounds and antiradical activity in lettuce (Lactuca sativa L.). Sci. Hortic. *187*, 93–101.

Gallois, P., and Marinho, P. (1995). Leaf disk transformation using Agrobacterium tumefaciens: Expression of heterologous genes in tobacco. In Methods in Molecular Biology; Plant Gene Transfer and Expression Protocols, H. Jones, ed. (Lab. Physiologie Biologie Molecularie Vegetale, Univ. Perpignan, Perpignan, France), pp. 39–48.

Gao, L., and Mazza, G. (1995). Characterization, Quantitation, and Distribution of Anthocyanins and Colorless Phenolics in Sweet Cherries. J. Agric. Food Chem. *43*, 343–346.

Gebauer, R.L.E., Strain, B.R., and Reynolds, J.P. (1998). The effect of elevated CO2 and N availability on tissue concentrations and whole plant pools of carbon-based secondary compounds in loblolly pine (Pinus taeda). Oecologia *113*, 29–36.

Giorgi, A., Mingozzi, M., Madeo, M., Speranza, G., and Cocucci, M. (2009). Effect of nitrogen starvation on the phenolic metabolism and antioxidant properties of yarrow (Achillea collina Becker ex Rchb.). Food Chem. *114*, 204–211.

Giorgi, A., Manzo, A., Vagge, I., and Panseri, S. (2014). Effect of Light Environment on Growth and Phenylpropanoids of Yarrow (Achillea collina cv. SPAK) Grown in the Alps. Photochem. Photobiol. *90*, 113–120.

Gopal, G.J., and Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. Protein J. *32*, 419–425.

Goulet, C., Kamiyoshihara, Y., Lam, N.B., Richard, T., Taylor, M.G., Tieman, D.M., and Klee, H.J. (2015). Divergence in the enzymatic activities of a tomato and Solanum pennellii alcohol acyltransferase impacts fruit volatile ester composition. Mol. Plant *8*, 153–162.

Gowher.A., . Fazal. H., . Zahir. A., . Muhammad. T., and Muhammad .A.K. (2007). Callus Induction and in vitro Complete Plant Regeneration of Different Cultivars of Tobacco (Nicotiana tabacum L.) on Media of Different Hormonal Concentrations. Biotechnology; *6*, 561–566.

Grace, S.C., and Logan, B.A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *355*, 1499–1510.

Grace, S.C., Logan, B.A., and Adams, W.W. (1998). Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in Mahonia repens. Plant Cell Environ. *21*, 513–521.

Gross, G.G., Stöckigt, J., Mansell, R.L., and Zenk, M.H. (1973). Three novel enzymes involved in the reduction of ferulic acid to coniferyl alcohol in higher plants: ferulate: Co a ligase, feruloyl-Co a reductase and coniferyl alcohol oxidoreductase. FEBS Lett. *31*, 283–286.

Grothe, T., Lenz, R., and Kutchan, T.M. (2001). Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy Papaver somniferum. J. Biol. Chem. *276*, 30717–30723.

Guan, Y.Q., Wu, T., Lin, M., and Ye, J.N. (2006). Determination of pharmacological ly active ingredients in sweet potato (Ipomoea batatas L.) by capillary electrophoresis with electrochemical detection. J. Agric. Food Chem. *54*, 24–28.

Guo, W., Wang, L., Gao, Y., Zhao, B., Wang, D., Duan, W., and Yu, Z. (2015). Isolation of isochlorogenic acid isomers in flower buds of Lonicera japonica by high-speed counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B *981–982*, 27–32.

Gyawali, R., and Ibrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. Food Control *46*, 412–429.

Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1989). Physiology and Molecular-Biology of Phenylpropanoid Metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. *40*, 347–369.

Hanson, K.R. (1965). Chlorogenic acid biosynthesis. Chemical synthesis and properties of the mono-O-cinnamoylquinic acids. Biochemistry (Mosc.) *4*, 2719–2731.

Harrison, H.F., Peterson, J.K., Clark, C.A., and Snook, M.E. (2001). Sweetpotato periderm components inhibit in vitro growth of root rotting fungi. Hortscience *36*, 927–930.

Harrison, H.F., Peterson, J.K., Snook, M.E., Bohac, J.R., and Jackson, D.M. (2003). Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [Ipomoea batatas (L.) Lam.] storage root periderm. J. Agric. Food Chem. *51*, 2943–2948.

Harrison, H.F., Mitchell, T.R., Peterson, J.K., Wechter, W.P., Majetich, G.F., and Snook, M.E. (2008). Contents of caffeoylquinic acid compounds in the storage roots of sixteen sweetpotato genotypes and their potetial biological activity. J. Am. Soc. Hortic. Sci. *133*, 492–500.

Hausler, M., Ganzera, M., Abel, G., Popp, M., and Stuppner, H. (2002). Determination of caffeoylquinic acids and flavonoids in Cynara scolymus L. by high performance liquid chromatography. Chromatographia *56*, 407–411.

Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R.M., and Fischer, R. (2004). Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. Nat. Biotechnol. *22*, 1415–1422.

Hilbert, G., Soyer, J.P., Molot, C., Giraudon, J., Milin, S., and Gaudillere, J.P. (2003). Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. Vitis *42*, 69–76.

Hirano, K., Aya, K., Kondo, M., Okuno, A., Morinaka, Y., and Matsuoka, M. (2012). OsCAD2 is the major CAD gene responsible for monolignol biosynthesis in rice culm. Plant Cell Rep. *31*, 91–101.

Hodge, A. (2004). The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. New Phytol. *162*, 9–24.

Hoffmann L., (2003). Thèse. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'hydroxycinnamoyl shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transférase.

Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M. (2003). Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism. J. Biol. Chem. *278*, 95–103.

Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M. (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell *16*, 1446–1465.

Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M. (2005). Acyltransferase-catalysed p-coumarate ester formation is a committed step of lignin biosynthesis. Plant Biosyst. *139*, 50–53.

Hohlfeld, M., Veit, M., and Strack, D. (1996). Hydroxycinnamoyltransferases Involved in the Accumulation of Caffeic Acid Esters in Gametophytes and Sporophytes of Equisetum arvense. Plant Physiol. *111*, 1153–1159.

Houghton, P.J. (1999). The scientific basis for the reputed activity of Valerian. J. Pharm. Pharmacol. *51*, 505–512.

Hsieh, C.-L., Yen, G.-C., and Chen, H.-Y. (2005). Antioxidant Activities of Phenolic Acids on Ultraviolet Radiation-Induced Erythrocyte and Low Density Lipoprotein Oxidation. J. Agric. Food Chem. *53*, 6151–6155.

Hu, G.B., Mei, X.G., Xiong, Q.B., Zhou, A.W., and Gong, W. (2002). Differential display reveals a cDNA coding for an acyltransferase-like protein specific to taxol synthesis in Taxus chinensis. Plant Mol. Biol. Report. *20*, 131–140.

Hu, Z., Chen, D., Dong, L., and Southerland, W.M. (2010). Prediction of the Interaction of Hiv-1 Integrase and Its Dicaffeoylquinic Acid Inhibitor Through Molecular Modeling Approach. Ethn. Dis. *20*, 45–49.

Hudson, J.B. (2010). The multiple actions of the phytomedicine Echinacea in the treatment of colds and flu. J. Med. Plants Res. *4*, 2746–2752.

Hung, T.M., Na, M., Thuong, P.T., Su, N.D., Sok, D., Song, K.S., Seong, Y.H., and Bae, K. (2006). Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of Dipsacus asper Wall. J. Ethnopharmacol. *108*, 188–192.

Islam, S. (2006). Sweetpotato (Ipomoea batatas L.) leaf: Its potential effect on human health and nutrition. J. Food Sci. *71*, R13–R21.

Islam, M.S., Yoshimoto, M., Yahara, S., Okuno, S., Ishiguro, K., and Yamakawa, O. (2002). Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (Ipomoea batatas L.) genotypes. J. Agric. Food Chem. *50*, 3718–3722.

Islam, M.S., Yoshimoto, M., and Yamakawa, O. (2003). Distribution and Physiological Functions of Caffeoylquinic Acid Derivatives in Leaves of Sweetpotato Genotypes. J. Food Sci. *68*, 111–116.

Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., and Fujita, T. (2004). In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. J. Agric. Food Chem. *52*, 4893–4898.

Jaiswal, R., and Kuhnert, N. (2010). Hierarchical scheme for liquid chromatography/multi-stage spectrometric identification of 3,4,5-triacyl chlorogenic acids in green Robusta coffee beans. Rapid Commun. Mass Spectrom. *24*, 2283–2294.

Jaiswal, R., Patras, M.A., Eravuchira, P.J., and Kuhnert, N. (2010a). Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MS(n): identification of seven new classes of compounds. J. Agric. Food Chem. *58*, 8722–8737.

Jaiswal, R., Sovdat, T., Vivan, F., and Kuhnert, N. (2010b). Profiling and Characterization by LC-MSn of the Chlorogenic Acids and Hydroxycinnamoylshikimate Esters in Maté (Ilex paraguariensis). J. Agric. Food Chem. *58*, 5471–5484.

Jaiswal, R., Deshpande, S., and Kuhnert, N. (2011). Profiling the chlorogenic acids of Rudbeckia hirta, Helianthus tuberosus, Carlina acaulis and Symphyotrichum novae-angliae leaves by LC-MS(n). Phytochem. Anal. PCA *22*, 432–441.

Jaiswal, R., Matei, M.F., Golon, A., Witt, M., and Kuhnert, N. (2012). Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies. Food Funct. *3*, 976–984.

Jiang, X., Liu, Y., Li, W., Zhao, L., Meng, F., Wang, Y., Tan, H., Yang, H., Wei, C., Wan, X., *et al*. (2013). Tissue-Specific, Development-Dependent Phenolic Compounds Accumulation Profile and Gene Expression Pattern in Tea Plant [Camellia sinensis]. Plos One *8*, e62315.

Joët, T., Laffargue, A., Salmona, J., Doulbeau, S., Descroix, F., Bertrand, B., de Kochko, A., and Dussert, S. (2009). Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds: Coffea arabica as a case study. New Phytol. *182*, 146–162.

Joet, T., Salmona, J., Laffargue, A., Descroix, F., and Dussert, S. (2010). Use of the growing environment as a source of variation to identify the quantitative trait transcripts and modules of co-expressed genes that determine chlorogenic acid accumulation. Plant Cell Environ. *33*, 1220–1233.

Jørgensen, K., Rasmussen, A.V., Morant, M., Nielsen, A.H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., and Møller, B.L. (2005). Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. Curr. Opin. Plant Biol. *8*, 280–291.

Junguang Xu, X.Z. (2007). Antifungal activity of oligochitosan against Phytophthora capsici and other plant pathogeni fungi in vitro. Pestic. Biochem. Physiol. *87*, 220–228.

Kaiser, N., Birkholz, D., Colomban, S., Navarini, L., and Engelhardt, U.H. (2013). A new method for the preparative isolation of chlorogenic acid lactones from coffee and model roasts of 5-caffeoylquinic acid. J. Agric. Food Chem. *61*, 6937–6941.

Kapust, R.B., and Waugh, D.S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. Protein Sci. *8*, 1668–1674.

Kasai, H., Fukada, S., Yamaizumi, Z., Sugie, S., and Mori, H. (2000). Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. Food Chem. Toxicol. *38*, 467–471.

Ke, D., and Saltveit, M.E. (1988). Plant Hormone Interaction and Phenolic Metabolism in the Regulation of Russet Spotting in Iceberg Lettuce 1. Plant Physiol. *88*, 1136–1140.

Kennes, D., Nalakath Abubackar, H., Diaz, M., Veiga, M.C., and Kennes, C. (2016). Bioethanol production from biomass: carbohydrate vs syngas fermentation. J. Chem. Technol. Biotechnol. *91*, 304–317.

Kim, B.-G., Jung, W.D., Mok, H., and Ahn, J.-H. (2013). Production of hydroxycinnamoyl-shikimates and chlorogenic acid in Escherichia coli: production of hydroxycinnamic acid conjugates. Microb. Cell Factories *12*, 15.

Kim, J.Y., Cho, J.-Y., Ma, Y.-K., Park, K.Y., Lee, S.-H., Ham, K.-S., Lee, H.J., Park, K.-H., and Moon, J.-H. (2011). Dicaffeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (Salicornia herbacea L.) and their antioxidative activity. Food Chem. *125*, 55–62.

Kim, S.S., Park, R.Y., Jeon, H.J., Kwon, Y.S., and Chun, W. (2005). Neuroprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. Phytother. Res. *19*, 243–245.

Koch, U., Kühnl, T., Conradt, W., and Wellmann, E. (1990). Differential effects of light and fungal elicitor on chlorogenic acid and caffeoylshikimic acid metabolism. Plant Sci. *70*, 167–174.

Kojima, M., and Kondo, T. (1985). An Enzyme in Sweet Potato Root which Catalyzes the Conversion of Chlorogenic Acid, 3-Caffeoylquinic Acid, to Isochlorogenic Acid, 3,5-Dicaffeoylquinic Acid. Agric. Biol. Chem. *49*, 2467–2469.

Kojima, M., and Uritani, I. (1972). Elucidation of the structure of a possible intermediate in chlorogenic acid biosynthesis in sweet potato root tissue. Plant Cell Physiol. *13*, 1075–1084.

Konczak, I., Okuno, S., Yoshimoto, M., and Konczak, I. (2004). Caffeoylquinic acids generated in vitro in a high-anthocyanin-accumulating sweet potato cell line. J. Biomed. Biotechnol. 287–292.

Konczak, I., Terahara, N., Yoshimoto, M., Nakatani, M., Yoshinaga, M., and Yamakawa, O. (2005). Regulating the composition of anthocyanins and phenolic acids in a sweetpotato cell culture towards production of polyphenolic complex with enhanced physiological activity. Trends Food Sci. Technol. *16*, 377–388.

Kongpichitchoke, T., Hsu, J.-L., and Huang, T.-C. (2015). Number of Hydroxyl Groups on the B-Ring of Flavonoids Affects Their Antioxidant Activity and Interaction with Phorbol Ester Binding Site of PKCδ C1B Domain: In Vitro and in Silico Studies. J. Agric. Food Chem. *63*, 4580–4586.

Kono, Y., Shibata, H., Kodama, Y., and Sawa, Y. (1995). The suppression of the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. Biochem. J. *312*, 947–953.

Koshiro, Y., Jackson, M.C., Katahira, R., Wang, M.-L., Nagai, C., and Ashihara, H. (2007). Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of Coffea arabica and Coffea canephora plants. Z. Für Naturforschung C J. Biosci. *62*, 731–742.

Koukol, J., and Conn, E. (1961). Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants .4. Purification and Properties of Phenylalanine Deaminase of Hordeum Vulgare. J. Biol. Chem. *236*, 2692-.

Kovacik, J., Klejdus, B., Backor, M., and Repcak, M. (2007). Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient Matricaria chamomilla leaf rosettes. Plant Sci. *172*, 393–399.

Kuhn, B.M., Geisler, M., Bigler, L., and Ringli, C. (2011). Flavonols Accumulate Asymmetrically and Affect Auxin Transport in Arabidopsis. Plant Physiol. *156*, 585–595.

Kuhnert, N., Jaiswal, R., Eravuchira, P., El-Abassy, R.M., von der Kammer, B., and Materny, A. (2011). Scope and limitations of principal component analysis of high resolution LC-TOF-MS data: the analysis of the chlorogenic acid fraction in green coffee beans as a case study. Anal. Methods *3*, 144–155.

Kumar, S., and Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal *2013*, 162750.

Kurata, R., Adachi, M., Yamakawa, O., and Yoshimoto, M. (2007). Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (Ipomoea batatas L.) leaves. J. Agric. Food Chem. *55*, 185–190.

La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., and Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. Immunol. Rev. *198*, 267–284.

Labrou, N.E., Muharram, M.M., and Abdelkader, M.S. (2016). Delineation of the structural and functional role of Arg111 in GSTU4-4 from Glycine max by chemical modification and site-directed mutagenesis. Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteomics *1864*, 1315–1321.

Lallemand, L.A., Zubieta, C., Lee, S.G., Wang, Y., Acajjaoui, S., Timmins, J., McSweeney, S., Jez, J.M., McCarthy, J.G., and McCarthy, A.A. (2012). A structural basis for the biosynthesis of the major chlorogenic acids found in coffee. Plant Physiol. *160*, 249–260.

Lee, D., and Douglas, C.J. (1996a). Two Divergent Members of a Tobacco 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase (4CL) Gene Family (cDNA Structure, Gene Inheritance and Expression, and Properties of Recombinant Proteins). Plant Physiol. *112*, 193–205.

Lee, J., and Scagel, C.F. (2013). Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. Front. Chem. *1*.

Lee, Y., Chen, F., Gallego-Giraldo, L., Dixon, R.A., and Voit, E.O. (2011). Integrative Analysis of Transgenic Alfalfa (Medicago sativa L.) Suggests New Metabolic Control Mechanisms for Monolignol Biosynthesis. Plos Comput. Biol. *7*, e1002047.

Legrand G., Thèse (2015). Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée: approches biochimiques et moléculaire.

León, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M.A., and Raskin, I. (1995). Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 10413–10417.

Lepelley, M., Cheminade, G., Tremillon, N., Simkin, A., Caillet, V., and McCarthy, J. (2007). Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in C. canephora. Plant Sci. *172*, 978–996.

Leser, C., and Treutter, D. (2005). Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. Physiol. Plant. *123*, 49–56.

Lévesque, F., and Seeberger, P.H. (2012). Continuous-Flow Synthesis of the Anti-Malaria Drug Artemisinin. Angew. Chem. Int. Ed. *51*, 1706–1709.

Li, X., Guo, L., Sun, Y., Zhou, J., Gu, Y., and Li, Y. (2010). Baicalein inhibits melanogenesis through activation of the ERK signaling pathway. Int. J. Mol. Med. *25*, 923–927.

Lim, S., Xu, J., Kim, J., Chen, T.-Y., Su, X., Standard, J., Carey, E., Griffin, J., Herndon, B., Katz, B., *et al*. (2013). Role of anthocyanin-enriched purple-fleshed sweet potato p40 in colorectal cancer prevention. Mol. Nutr. Food Res. *57*, 1908–1917.

Liu, W., and Saint, D.A. (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. Anal. Biochem. *302*, 52–59.

Loebenstein et Thottapilly (2009). The Sweetpotato (Dordrecht: Springer Netherlands).

Long, M.C., Nagegowda, D.A., Kaminaga, Y., Ho, K.K., Kish, C.M., Schnepp, J., Sherman, D., Weiner, H., Rhodes, D., and Dudareva, N. (2009). Involvement of snapdragon benzaldehyde dehydrogenase in benzoic acid biosynthesis. Plant J. Cell Mol. Biol. *59*, 256–265.

Lotfy, S. (1995). Inactivation and Kinetic Characterization of Hydroxycinnamoyl-Coa - Hydroaromatic Acid O-Hydroxycinnamoyltransferases from Cichorium-Endivia and Phoenix-Dactylifera. Plant Physiol. Biochem. *33*, 423–431.

Luo, J., Nishiyama, Y., Fuell, C., Taguchi, G., Elliott, K., Hill, L., Tanaka, Y., Kitayama, M., Yamazaki, M., Bailey, P., *et al*. (2007). Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from Arabidopsis thaliana. Plant J. *50*, 678–695.

Ma, D., Li, Y., Zhang, J., Wang, C., Qin, H., Ding, H., Xie, Y., and Guo, T. (2016). Accumulation of Phenolic Compounds and Expression Profiles of Phenolic Acid Biosynthesis-Related Genes in Developing Grains of White, Purple, and Red Wheat. Front. Plant Sci. *7*, 528.

Ma, X.Y., Koepke, J., Panjikar, S., Fritzsch, G., and Stockigt, J. (2005). Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. J. Biol. Chem. *280*, 13576–13583.

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., and Jay-Allemand, C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique (PPUR presses polytechniques).

Macoy, D.M., Kim, W.-Y., Lee, S.Y., and Kim, M.G. (2015). Biosynthesis, physiology, and functions of hydroxycinnamic acid amides in plants. Plant Biotechnol. Rep. *9*, 269–278.

Mahesh, V., Million-Rousseau, R., Ullmann, P., Chabrillange, N., Bustamante, J., Mondolot, L., Morant, M., Noirot, M., Hamon, S., Kochko, A. de, *et al*. (2007). Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3′-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. Plant Mol. Biol. *64*, 145–159.

Maier, V., Metzler, D., and Huber, A. (1964). 3-3-Caffeoylshikimic Acid (Dactylifric Acid) + Its Isomers a New Class. Biochem. Biophys. Res. Commun. *14*, 124-.

de Marco, A., Vigh, L., Diamant, S., and Goloubinoff, P. (2005). Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in Escherichia coli by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol-overexpressed molecular chaperones. Cell Stress Chaperones *10*, 329–339.

Matern, U., and Kneusel, R.E. (1988). Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica *16*, 153–170.

Matsuda, F., Morino, K., Miyashita, M., and Miyagawa, H. (2003a). Metabolic Flux Analysis of the Phenylpropanoid Pathway in Wound-Healing Potato Tuber Tissue using Stable Isotope-Labeled Tracer and LC-MS Spectroscopy. Plant Cell Physiol. *44*, 510–517.

Mattila, P., and Hellström, J. (2007). Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. J. Food Compos. Anal. *20*, 152–160.

McGregor, C.E. (2006). Differential Expression and Detection of Transcripts in Sweetpotato (Ipomoea Batatas (L.) Lam.) Using CDNA Microarrays.

Meng, Y., Zhang, Q., Ding, W., and Shan, W. (2014). Phytophthora parasitica: a model oomycete plant pathogen. Mycology *5*, 43–51.

Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Steenkamp, P.A., Madala, N.E., and Dubery, I.A. (2014). Priming agents of plant defence stimulate the accumulation of mono- and di-acylated quinic acids in cultured tobacco cells. Physiol. Mol. Plant Pathol. *88*, 61–66.

Miguel S. (2013). Développement d'une plateforme végétale de production des protéines recombinanates par l'utilisation de plantes carnivores du genre Nepenthes.

Minami, H. (2013). Fermentative Production of Plant Benzylisoquinoline Alkaloids in Microbes. Biosci. Biotechnol. Biochem. *77*, 1617–1622.

Miralpeix, B., Rischer, H., Hakkinen, S.T., Ritala, A., Seppanen-Laakso, T., Oksman-Caldentey, K.-M., Capell, T., and Christou, P. (2013). Metabolic Engineering of Plant Secondary Products: Which Way Forward? Curr. Pharm. Des. *19*, 5622–5639.

Moglia, A., Lanteri, S., Comino, C., Acquadro, A., de Vos, R., and Beekwilder, J. (2008). Stress-induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. J. Agric. Food Chem. *56*, 8641–8649.

Moglia, A., Lanteri, S., Comino, C., Hill, L., Knevitt, D., Cagliero, C., Rubiolo, P., Bornemann, S., and Martin, C. (2014). Dual catalytic activity of hydroxycinnamoyl-CoA quinate transferase from tomato allows it to moonlight in the synthesis of both mono- and dicaffeoylquinic acids. Plant Physiol. pp.114.251371.

Molgaard, P., and Ravn, H. (1988). Evolutionary Aspects of Caffeoyl Ester Distribution in Dicotyledons. Phytochemistry *27*, 2411–2421.

Mondolot, L., La Fisca, P., Buatois, B., Talansier, E., De Kochko, A., and Campa, C. (2006). Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during Coffea canephora leaf development. Ann. Bot. *98*, 33–40.

Morales, F., Cartelat, A., Álvarez-Fernández, A., Moya, I., and Cerovic, Z.G. (2005). Time-Resolved Spectral Studies of Blue−Green Fluorescence of Artichoke (Cynara cardunculus L. Var. Scolymus) Leaves: Identification of Chlorogenic Acid as One of the Major Fluorophores and Age-Mediated Changes. J. Agric. Food Chem. *53*, 9668–9678.

Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., De Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P. (2010). Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. J. Integr. Plant Biol. *52*, 360–376.

Mueller, R.L. (2004). First-generation agents: aspirin, heparin and coumarins. Best Pract. Res. Clin. Haematol. *17*, 23–53.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. *15*, 473–497.

Murata, M., Sugiura, M., Sonokawa, Y., Shimamura, T., and Homma, S. (2002). Properties of chlorogenic acid quinone: Relationship between browning and the formation of hydrogen peroxide from a quinone solution. Biosci. Biotechnol. Biochem. *66*, 2525–2530.

Murthy, H.N., Kim, Y.-S., Park, S.-Y., and Paek, K.-Y. (2014a). Biotechnological production of caffeic acid derivatives from cell and organ cultures of Echinacea species. Appl. Microbiol. Biotechnol. *98*, 7707–7717.

Murthy, H.N., Lee, E.-J., and Paek, K.-Y. (2014b). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. Plant Cell Tissue Organ Cult. *118*, 1–16.

Naczk, M., and Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. J. Pharm. Biomed. Anal. *41*, 1523–1542.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. J. Biosci. Bioeng. *104*, 34–41.

Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., and Mitani, T. (2000). Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (Prunus domestica L.). J. Agric. Food Chem. *48*, 5512–5516.

Nakayama, T., Suzuki, H., and Nishino, T. (2003). Anthocyanin acyltransferases: specificities, mechanism, phylogenetics, and applications. J. Mol. Catal. B-Enzym. *23*, 117–132.

Nedunchezhiyan, M., Byju, G., and Jata, S.K. (2012). Sweet potato agronomy. Fruit Veg. Cereal Sci. Biotechnol. Glob. Sci. Books 1–10.

Negi, S., Barry, A.N., Friedland, N., Sudasinghe, N., Subramanian, S., Pieris, S., Holguin, F.O., Dungan, B., Schaub, T., and Sayre, R. (2015). Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in Chlorella sorokiniana. J. Appl. Phycol. *28*, 803–812.

Neish, A. (1961). Formation of Meta-Coumaric and Para-Coumaric Acids by Enzymatic Deamination of the Corresponding Isomers of Tyrosine. Phytochemistry *1*, 1–24.

Nichols, J.A., and Katiyar, S.K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. Arch. Dermatol. Res. *302*, 71–83.

Niggeweg, R., Michael, A.J., and Martin, C. (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. Nat. Biotechnol. *22*, 746–754.

Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., and Yura, T. (1998). Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2 in Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 1694–1699.

Nishizawa, M., Izuhara, R., Kaneko, K., and Fujimoto, Y. (1987). 3-Caffeoyl-4-sinapoylquinic acid, a novel lipoxygenase inhibitor from Gardeniae fructus. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) *35*, 2133–2135.

Ober, D. (2005). Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism. Trends Plant Sci. *10*, 444–449.

Ober, D. (2010). Gene duplications and the time thereafter - examples from plant secondary metabolism. Plant Biol. *12*, 570–577.

Oki, T., Masuda, M., Furuta, S., Nishiba, Y., Terahara, N., and Suda, I. (2002). Involvement of Anthocyanins and other Phenolic Compounds in Radical-Scavenging Activity of Purple-Fleshed Sweet Potato Cultivars. J. Food Sci. *67*, 1752–1756.

Osbourn, A.E., and Lanzotti, V. (2009). Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application (Springer Science & Business Media).

Padda, M.S., and Picha, D.H. (2008). Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes. Sci. Hortic. *119*, 17–20.

Padmaja, G. (2009). Uses and Nutritional Data of Sweetpotato (Padmaja, G.; Cent Tuber Crops Res Inst, Trivandrum, Kerala, India).

Park, S.-C., Kim, Y.-H., Ji, C.Y., Park, S., Jeong, J.C., Lee, H.-S., and Kwak, S.-S. (2012). Stable internal reference genes for the normalization of real-time PCR in different sweetpotato cultivars subjected to abiotic stress conditions. PloS One *7*, e51502.

Parveen, I., Threadgill, M.D., Hauck, B., Donnison, I., and Winters, A. (2011). Isolation, identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemicals, in the leaves and stems of Miscanthus x giganteus using LC-ESI-MSn. Phytochemistry *72*, 2376–2384.

Peluso, G., Defeo, V., Desimone, F., Bresciano, E., and Vuotto, M. (1995). Studies on the Inhibitory Effects of Caffeoylquinic Acids on Monocyte Migration and Superoxide Ion Production. J. Nat. Prod.-Lloydia *58*, 639–646.

Peng, Z., Li, L., Yang, L., Zhang, B., Chen, G., and Bi, Y. (2013). Overexpression of Peanut Diacylglycerol Acyltransferase 2 in Escherichia coli. PLoS ONE *8*.

Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Spring, J.-L. (2004). Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. Physiol. Mol. Plant Pathol. *65*, 297–303.

Pfeffer, S., Richards, K., and Jonard, G. (2003). L'extinction de gènes chez les plantes révèle un mécanisme de défense antiviral surmonté par les phytovirus. Virologie *7*, 353–366.

Pichersky, E., and Gang, D.R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. Trends Plant Sci. *5*, 439–445.

Pietta, P., Mauri, P., and Bauer, R. (1998). MEKC analysis of different Echinacea species. Planta Med. *64*, 649–652.

Pilar Lopez-Gresa, M., Torres, C., Campos, L., Lison, P., Rodrigo, I., Maria Belles, J., and Conejero, V. (2011). Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen Pseudomonas syringae. Environ. Exp. Bot. *74*, 216–228.

Piotrowska, H., Kucinska, M., and Murias, M. (2012). Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. Mutat. Res. Mutat. Res. *750*, 60–82.

Pisoschi, A.M., and Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. Eur. J. Med. Chem. *96*, 55–74.

Reglinski, T., Elmer, P. a. G., Taylor, J.T., Wood, P.N., and Hoyte, S.M. (2010). Inhibition of Botrytis cinerea growth and suppression of botrytis bunch rot in grapes using chitosan. Plant Pathol. *59*, 882–890.

Reichert, A.I., He, X.-Z., and Dixon, R.A. (2009). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (Nicotiana tabacum): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. Biochem. J. *424*, 233–242.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. *20*, 933–956.

Richter G, (1993), Métabolisme des végétaux: physiologie & biochimie. Ed. Lavoisier.

Rischer, H., Häkkinen, S.T., Ritala, A., Seppänen-Laakso, T., Miralpeix, B., Capell, T., Christou, P., and Oksman-Caldentey, K.-M. (2013). Plant cells as pharmaceutical factories. Curr. Pharm. Des. *19*, 5640–5660.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., and Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chem. *66*, 401–436.

Roberts, null, and Shuler, null (1997). Large-scale plant cell culture. Curr. Opin. Biotechnol. *8*, 154–159.

Robinson, D. (1994). The Responses of Plants to Nonuniform Supplies of Nutrients. New Phytol. *127*, 635–674.

Rosano, G.L., and Ceccarelli, E.A. (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted Escherichia coli strain. Microb. Cell Factories *8*, 41.

Rosano, G.L., and Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Front. Microbiol. *5*.

Rosler, J., Krekel, F., Amrhein, N., and Schmid, J. (1997). Maize Phenylalanine Ammonia-Lyase Has Tyrosine Ammonia-Lyase Activity. Plant Physiol. *113*, 175–179.

Roth, I., and Lindorf, H. (2013). South American Medicinal Plants: Botany, Remedial Properties and General Use (Springer Science & Business Media).

Rumbaoa, R.G.O., Cornago, D.F., and Geronimo, I.M. (2009). Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (Ipomoea batatas) varieties. Food Chem. *113*, 1133–1138.

Rupprich, N., and Kindl, H. (1978). Stilbene synthases and stilbenecarboxylate synthases, I Enzymatic synthesis of 3,5,4-trihydroxystilbene from p-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. Hoppe-Seylers Z. Für Physiol. Chem. *359*, 165–172.

Sánchez-Maldonado, A.F., Schieber, A., and Gänzle, M.G. (2016). Antifungal activity of secondary plant metabolites from potatoes (Solanum tuberosum L.): Glycoalkaloids and phenolic acids show synergistic effects. J. Appl. Microbiol.

Sander, M., and Petersen, M. (2011). Distinct substrate specificities and unusual substrate flexibilities of two hydroxycinnamoyltransferases, rosmarinic acid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl-transferase, from Coleus blumei Benth. Planta *233*, 1157–1171.

Scheible, W.R., Lauerer, M., Schulze, E.D., Caboche, M., and Stitt, M. (1997). Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. Plant J. *11*, 671–691.

Schmidt, G.W., and Delaney, S.K. (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (Nicotiana tabacum) during development and abiotic stress. Mol. Genet. Genomics MGG *283*, 233–241.

Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., and Werck-Reichhart, D. (2001). CYP98A3 from Arabidopsis thaliana Is a 3′-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway. J. Biol. Chem. *276*, 36566–36574.

Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R., and Schieber, A. (2004). Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (Cynara scolymus L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS(n). J. Agric. Food Chem. *52*, 4090–4096.

Seehuber, R. (1990). Alkaloid Content in Poppy (papaver-Somniferum L) and Their Importance in Oil Production. Landbauforsch. Volkenrode *40*, 209–212.

Sekar, N., Veetil, S.K., and Neerathilingam, M. (2013). Tender coconut water an economical growth medium for the production of recombinant proteins in Escherichia coli. BMC Biotechnol. *13*, 70.

Sepulveda, L., Ascacio, A., Rodriguez-Herrera, R., Aguilera-Carbo, A., and Aguilar, C.N. (2011). Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. Afr. J. Biotechnol. *10*, 4518–4523.

Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., Bar, E., Tamari, T., Menda, N., Adam, Z., Zamir, D., Vainstein, A., Weiss, D., *et al*. (2003). Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals. Plant Physiol. *131*, 1868–1876.

Shaw, W.V. (1992). Chemical anatomy of antibiotic resistance: chloramphenicol acetyltransferase. Sci. Prog. *76*, 565–580.

Shibata, H., Sakamoto, Y., Oka, M., and Kono, Y. (1999). Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. Biosci. Biotechnol. Biochem. *63*, 1295–1297.

da Silva, A.I., Santana, C.S., Pivato, S.C.L., De Maria, C. a. B., and Moreira, R.F.A. (2006). Chlorogenic acid profile of commercial Brazilian herbal infusions. Sci. Aliments *26*, 173–180.

Simmler, C., Pauli, G.F., and Chen, S.-N. (2013). Phytochemistry and biological properties of glabridin. Fitoterapia *90*, 160–184.

Simons, R., Gruppen, H., Bovee, T.F.H., Verbruggen, M.A., and Vincken, J.-P. (2012). Prenylated isoflavonoids from plants as selective estrogen receptor modulators (phytoSERMs). Food Funct. *3*, 810–827.

Smith, D., and Johnson, K. (1988). Single-Step Purification of Polypeptides Expressed in Escherichia-Coli. Gene *67*, 31–40.

Son, K., Severson, R., Snook, M., and Kays, S. (1991). Root Carbohydrate, Organic-Acids, and Phenolic Chemistry in Relation to Sweet-Potato Weevil Resistance. Hortscience *26*, 1305–1308.

Sonnante, G., D'Amore, R., Blanco, E., Pierri, C.L., Palma, M.D., Luo, J., Tucci, M., and Martin, C. (2010). Novel Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase Genes from Artichoke Are Involved in the Synthesis of Chlorogenic Acid. Plant Physiol. *153*, 1224–1238.

Soubeyrand, E., Basteau, C., Hilbert, G., van Leeuwen, C., Delrot, S., and Gomès, E. (2014). Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. Phytochemistry *103*, 38–49.

Speroni, E., Govoni, P., Guizzardi, S., Renzulli, C., and Guerra, M.C. (2002). Anti-inflammatory and cicatrizing activity of Echinacea pallida Nutt. root extract. J. Ethnopharmacol. *79*, 265–272.

Stange Jr, R.R., Midland, S.L., Holmes, G.J., Sims, J.J., and Mayer, R.T. (2001). Constituents from the periderm and outer cortex of Ipomoea batatas with antifungal activity against Rhizopus stolonifer. Postharvest Biol. Technol. *23*, 85–92.

Stockigt, J., and Zenk, M. (1975). Chemical Syntheses and Properties of Hydroxycinnamoyl Coenzyme a Derivatives. Z. Naturforschung C- J. Biosci. *30*, 352–358.

St-Pierre, B., and De Luca, V. (2000a). Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In Evolution of Metabolic Pathways, J.T. Romeo, R. Ibrahim, L. Varin, and V. DeLuca, eds. (Kidlington: Pergamon-Elsevier Science Ltd), pp. 285–315.

St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.M., and De Luca, V. (1998). The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. Plant J. Cell Mol. Biol. *14*, 703–713.

Studier, F.W. (2014). Stable Expression Clones and Auto-Induction for Protein Production in E-coli. In Structural Genomics: General Applications, Y.W. Chen, ed. (Totowa: Humana Press Inc), pp. 17–32.

Suberu, J.O., Gorka, A.P., Jacobs, L., Roepe, P.D., Sullivan, N., Barker, G.C., and Lapkin, A.A. (2013). Anti-Plasmodial Polyvalent Interactions in Artemisia annua L. Aqueous Extract – Possible Synergistic and Resistance Mechanisms. PLoS ONE *8*, e80790.

Sullivan, M.L. (2009). A Novel Red Clover Hydroxycinnamoyl Transferase Has Enzymatic Activities Consistent with a Role in Phaselic Acid Biosynthesis. Plant Physiol. *150*, 1866–1879.

Sullivan, M.L. (2014). Perennial peanut (Arachis glabrata Benth.) leaves contain hydroxycinnamoyl-CoA:tartaric acid hydroxycinnamoyl transferase activity and accumulate hydroxycinnamoyl-tartaric acid esters. Planta *239*, 1091–1100.

Sullivan, M.L., and Zarnowski, R. (2011). Red Clover HCT2, a Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: Malate Hydroxycinnamoyl Transferase, Plays a Crucial Role in Biosynthesis of Phaselic Acid and Other Hydroxycinnamoyl-Malate Esters in Vivo. Plant Physiol. *155*, 1060–1067.

Summers, C.B., and Felton, G.W. (1994). Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore Helicoverpa zea (Lepidoptera: Noctuidae): Potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. Insect Biochem. Mol. Biol. *24*, 943–953.

Sun, H., Li, Y., Feng, S., Zou, W., Guo, K., Fan, C., Si, S., and Peng, L. (2013). Analysis of five rice 4-coumarate:coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice. Biochem. Biophys. Res. Commun. *430*, 1151–1156.

Sun, H., Mu, T., Xi, L., Zhang, M., and Chen, J. (2014). Sweet potato (Ipomoea batatas L.) leaves as nutritional and functional foods. Food Chem. *156*, 380–389.

Suzuki, H., Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Fukui, Y., Nakamura, N., Yamaguchi, M.-A., Tanaka, Y., Kusumi, T., and Nishino, T. (2002). cDNA cloning, heterologous expressions, and functional characterization of malonyl-coenzyme a:anthocyanidin 3-o-glucoside-6"-o-malonyltransferase from dahlia flowers. Plant Physiol. *130*, 2142–2151.

Suzuki, H., Nakayama, T., and Nishino, T. (2003). Proposed mechanism and functional amino acid residues of malonyl-CoA:anthocyanin 5-O-glucoside-6’’’-O-malonyltransferase from flowers of Salvia splendens, a member of the versatile plant acyltransferase family. Biochemistry (Mosc.) *42*, 1764–1771.

Swartzberg, D., Kirshner, B., Rav-David, D., Elad, Y., and Granot, D. (2008). Botrytis cinerea induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the IPT gene. Eur. J. Plant Pathol. *120*, 289–297.

Takenaka, M., Nanayama, K., Isobe, S., and Murata, M. (2006). Changes in caffeic acid derivatives in sweet potato (Ipomoea batatas L.) during cooking and processing. Biosci. Biotechnol. Biochem. *70*, 172–177.

Tamura, H., Akioka, T., Ueno, K., Chujyo, T., Okazaki, K., King, P.J., and Robinson, W.E. (2006). Anti-human immunodeficiency virus activity of 3,4,5-tricaffeoylquinic acid in cultured cells of lettuce leaves. Mol. Nutr. Food Res. *50*, 396–400.

Taylor, A.O., and Zucker, M. (1966). Turnover and Metabolism of Chlorogenic Acid in Xanthium Leaves and Potato Tubers. Plant Physiol. *41*, 1350–1359.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E.M., Garrido, J., and Borges, F. (2013). Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. BioMed Res. Int. *2013*, 251754.

Teramachi, F., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Hayashi, M., Komiyama, K., and Ishibashi, M. (2005). Collagenase inhibitory quinic acid esters from Ipomoea pes-caprae. J. Nat. Prod. *68*, 794–796.

Terryn, N., Van Montagu, M., Inze, D., and Goossens, A. (2006). Functional genomic approaches to study and engineer secondary metabolism in plant cell cultures (Dordrecht: Springer).

Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J.M., Jeltsch, J.M., Durst, F., and Werck-Reichhart, D. (1993). Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. *90*, 4102–4106.

Teutschbein, J., Gross, W., Nimtz, M., Milkowski, C., Hause, B., and Strack, D. (2010). Identification and localization of a lipase-like acyltransferase in phenylpropanoid metabolism of tomato (Solanum lycopersicum). J. Biol. Chem. *285*, 38374–38381.

Toiu, A., Vlase, L., Oniga, I., Benedec, D., and Tamas, M. (2011). Hplc Analysis of Salicylic Derivatives from Natural Products. Farmacia *59*, 106–112.

Truong, V.-D., McFeeters, R.F., Thompson, R.T., Dean, L.L., and Shofran, B. (2007). Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (Ipomea batatas L.) cultivars in the United States. J. Food Sci. *72*, C343–C349.

Tuan, P.A., Kwon, D.Y., Lee, S., Arasu, M.V., Al-Dhabi, N.A., Park, N.I., and Park, S.U. (2014). Enhancement of Chlorogenic Acid Production in Hairy Roots of Platycodon grandiflorum by Over-Expression of An Arabidopsis thaliana Transcription Factor AtPAP1. Int. J. Mol. Sci. *15*, 14743–14752.

Tuominen, L.K., Johnson, V.E., and Tsai, C.-J. (2011). Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among Populus paralogues. Bmc Genomics *12*, 236.

Tzin, V., and Galili, G. (2010). New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. Mol. Plant *3*, 956–972.

Unno, H., Ichimaida, F., Suzuki, H., Takahashi, S., Tanaka, Y., Saito, A., Nishino, T., Kusunoki, M., and Nakayama, T. (2007). Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis. J. Biol. Chem. *282*, 15812–15822.

Vaishnav, P., and Demain, A.L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. Biotechnol. Adv. *29*, 223–229.

Valiñas, M.A., Lanteri, M.L., ten Have, A., and Andreu, A.B. (2015). Chlorogenic Acid Biosynthesis Appears Linked with Suberin Production in Potato Tuber (Solanum tuberosum). J. Agric. Food Chem. *63*, 4902–4913.

Van Moerkercke, A., Schauvinhold, I., Pichersky, E., Haring, M.A., and Schuurink, R.C. (2009). A plant thiolase involved in benzoic acid biosynthesis and volatile benzenoid production. Plant J. *60*, 292–302.

Vanholme, B., Cesarino, I., Goeminne, G., Kim, H., Marroni, F., Van Acker, R., Vanholme, R., Morreel, K., Ivens, B., Pinosio, S., *et al*. (2013). Breeding with rare defective alleles (BRDA): a natural Populus nigra HCT mutant with modified lignin as a case study. New Phytol. *198*, 765–776.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. Plant Physiol. *153*, 895–905.

Vasilev, N., Schmitz, C., Groemping, U., Fischer, R., and Schillberg, S. (2014). Assessment of Cultivation Factors that Affect Biomass and Geraniol Production in Transgenic Tobacco Cell Suspension Cultures. Plos One *9*, e104620.

Villaverde, A., and Carrió, M.M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. Biotechnol. Lett. *25*, 1385–1395.

Villegas, R.J., and Kojima, M. (1986). Purification and characterization of hydroxycinnamoyl D-glucose. Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, Ipomoea batatas Lam. J. Biol. Chem. *261*, 8729–8733.

Villegas, R.J.A., Shimokawa, T., Okuyama, H., and Kojima, M. (1987). Purification and characterization of chlorogenic acid: Chlorogenate caffeoyl transferase in sweet potato roots. Phytochemistry *26*, 1577–1581.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. Mol. Plant *3*, 2–20.

Wagner, A., Ralph, J., Akiyama, T., Flint, H., Phillips, L., Torr, K., Nanayakkara, B., and Te Kiri, L. (2007). Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase in Pinus radiata. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 11856–11861.

Waldhauser, S.S.M., and Baumann, T.W. (1996). Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. Phytochemistry *42*, 985–996.

Walker, A.M., Hayes, R.P., Youn, B., Vermerris, W., Sattler, S.E., and Kang, C. (2013). Elucidation of the Structure and Reaction Mechanism of Sorghum Hydroxycinnamoyltransferase and Its Structural Relationship to Other Coenzyme A-Dependent Transferases and Synthases. Plant Physiol. *162*, 640–651.

Wang, B., Sun, W., Li, Q., Li, Y., Luo, H., Song, J., Sun, C., Qian, J., Zhu, Y., Hayward, A., *et al*. (2015). Genome-wide identification of phenolic acid biosynthetic genes in Salvia miltiorrhiza. Planta *241*, 711–725.

Wang, L., Liu, F., Jiang, Y., Chai, Z., Li, P., Cheng, Y., Jing, H., and Leng, X. (2011). Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films. J. Agric. Food Chem. *59*, 12411–12419.

Wang, W., Zhang, L., Le, Y., Chen, J.-F., Wang, J., and Yun, J. (2016). Synergistic effect of PEGylated resveratrol on delivery of anticancer drugs. Int. J. Pharm. *498*, 134–141.

Welch, M., Govindarajan, S., Ness, J.E., Villalobos, A., Gurney, A., Minshull, J., and Gustafsson, C. (2009). Design parameters to control synthetic gene expression in Escherichia coli. PloS One *4*, e7002.

Whitaker, B.D., and Stommel, J.R. (2003). Distribution of hydroxycinnamic acid conjugates in fruit of commercial eggplant (Solanum melongena L.) cultivars. J. Agric. Food Chem. *51*, 3448–3454.

Wilson, S.A., and Roberts, S.C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. Plant Biotechnol. J. *10*, 249–268.

Wu, Y.-H., Zhang, X.-M., Hu, M.-H., Wu, X.-M., and Zhao, Y. (2009). Effect of Laggera alata on hepatocyte damage induced by carbon tetrachloride in vitro and in vivo. J. Ethnopharmacol. *126*, 50–56.

Wu, Y.-H., Hao, B.-J., Cao, H.-C., Xu, W., Li, Y.-J., and Li, L.-J. (2012). Anti-Hepatitis B Virus Effect and Possible Mechanism of Action of 3,4-O-Dicaffeoylquinic Acid In Vitro and In Vivo. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 356806.

Xia, Y.J., Nicolau, B.J., and Schnable, P.S. (1996). Cloning and characterization of CER2, an Arabidopsis gene that affects cuticular wax accumulation. Plant Cell *8*, 1291–1304.

Xu, Q., Xie, H., Xiao, H., and Wei, X. (2013). Phenolic Constituents from the Roots of Mikania micrantha and Their Allelopathic Effects. J. Agric. Food Chem. *61*, 7309–7314.

Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E., and Matern, U. (1997). Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA : anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, Dianthus caryophyllus L. Plant Mol. Biol. *35*, 777–789.

Yang, X., Jiang, Y., Yang, J., He, J., Sun, J., Chen, F., Zhang, M., and Yang, B. (2015). Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. Trends Food Sci. Technol. *44*, 93–104.

Yoon, J., Choi, H., and An, G. (2015). Roles of lignin biosynthesis and regulatory genes in plant development. J. Integr. Plant Biol. *57*, 902–912.

Yoruk, R., Yoruk, S., Balaban, M.O., and Marshall, M.R. (2004). Machine vision analysis of antibrowning potency for oxalic acid: A comparative investigation on banana and apple. J. Food Sci. *69*, E281–E289.

Yoshimoto, M., Yahara, S., Okuno, S., Islam, M.S., Ishiguro, K., and Yamakawa, O. (2002). Antimutagenicity of mono-, di-, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (Ipomoea batatas L.) leaf. Biosci. Biotechnol. Biochem. *66*, 2336–2341.

Zeng, Q.-P., Zeng, L.-X., Lu, W.-J., Feng, L.-L., Yang, R.-Y., and Qiu, F. (2012). Enhanced artemisinin production from engineered yeast precursors upon biotransformation. Biocatal. Biotransformation *30*, 190–202.

Zhang, H., Rong, H., and Pilbeam, D. (2007). Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in Arabidopsis thaliana. J. Exp. Bot. *58*, 2329–2338.

Zhang, L., Wang, Z., and Zhang, W. (2013). [Determination of caftaric acid, p-coutaric acid and fertaric acid in grape juice, peel and seeds by ultra-high performance liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry]. Se Pu Chin. J. Chromatogr. Zhongguo Hua Xue Hui *31*, 122–126.

Zhang, Y., Chen, A.Y., Li, M., Chen, C., and Yao, Q. (2008). Ginkgo biloba extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. J. Surg. Res. *148*, 17–23.

Zheng, W., and Clifford, M.N. (2008). Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (Ipomoea batatas) from China. Food Chem. *106*, 147–152.

Zhong, R., Lee, C., McCarthy, R.L., Reeves, C.K., Jones, E.G., and Ye, Z.-H. (2011). Transcriptional activation of secondary wall biosynthesis by rice and maize NAC and MYB transcription factors. Plant Cell Physiol. *52*, 1856–1871.

Zhong, R.-F., Xu, G.-B., Wang, Z., Wang, A.-M., Guan, H.-Y., Li, J., He, X., Liu, J.-H., Zhou, M., Li, Y.-J., *et al*. (2015). Identification of anti-inflammatory constituents from Kalimeris indica with UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS and GC–MS. J. Ethnopharmacol. *165*, 39–45.

Zhu, F., Cai, Y.-Z., Yang, X., Ke, J., and Corke, H. (2010). Anthocyanins, Hydroxycinnamic Acid Derivatives, and Antioxidant Activity in Roots of Different Chinese Purple-Fleshed Sweetpotato Genotypes. J. Agric. Food Chem. *58*, 7588–7596.

Zhu, K., Cordeiro, M.L., Atienza, J., Robinson, W.E., and Chow, S.A. (1999). Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. J. Virol. *73*, 3309–3316.

Zhu, X.F., Zhang, H.X., and Lo, R. (2004). Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (Cynara scolymus L.) and their antimicrobial activities. J. Agric. Food Chem. *52*, 7272–7278.

Ziouti, A., ElModafar, C., ElMandili, A., ElBoustani, E., and Macheix, J.J. (1996). Identification of the caffeoylshikimic acids in the roots of the date palm, principle fungitoxic compounds vis-a-vis Fusarium-oxysporum f sp albedinis. J. Phytopathol.-Phytopathol. Z. *144*, 197–202.

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemples et localisation de quelques phénylpropanoïdes induits par un stress. _30
Figure 2 : Structure de base d'un groupement phénol aromatique et structure C6-C3 ____31
Figure 3 : Représentation schématique des deux voies alternatives de biosynthèse de l'acide p-coumarique _____32
Figure 4 : Représentation simplifiée des différentes voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes _____33
Figure 5 : Squelette moléculaire des flavonoïdes et classification générale des dérivés____36
Figure 6 : Classification des stilbènes et structure moléculaire des composés _____37
Figure 7 : Classes des coumarines et exemples de structures moléculaires _____38
Figure 8 : Structure et formation des trois unités monolignols composant les lignines ____39
Figure 9 : Structure de base des acides hydroxybenzoïques et quelques exemples de formes simples_____40
Figure 10 : Acide salicylique, extrait du saule, un ingrédient actif utilisé en cosmétique___41
Figure 11 : Structure de base des formes simples d'acides hydroxycinnamiques et principales classes des formes simples et conjuguées _____42
Figure 12 : Structures moléculaires des acides caféoylquiniques et exemples de dérivés___44
Figure 13 : Représentation simplifiée des voies proposées pour la biosynthèse d'acide chlorogénique chez les plantes _____55
Figure 14 : Structure cristallisée de la vinorine synthase._____58
Figure 15 : Arbre phylogénétique de la superfamille BAHD des acyltransférases _____59
Figure 16 : Représentation schématique de la plante Ipomoea batatas L. _____66
Figure 17 : Les différentes variétés de patate douce à chair violette, blanche et orange ___67
Figure 18 : Teneur en macronutriments et valeur énergétique de la patate douce _____68
Figure 19 : Distribution des acides caféoyl-quiniques et dérivés dans les différentes parties de la plante Ipomoea batatas _____70
Figure 20 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'une racine de stockage de patate douce _____71
Figure 21 : Représentation schématique du plasmide pCR8/GW/TOPO_____80
Figure 22 : Représentation schématique du plasmide pET28b _____82
Figure 23 : Séquence nucléotidique de la région d'expression du système pET _____83
Figure 24 : Représentation schématique du plasmide pET3a._____84
Figure 25 : Représentation schématique du pQE30. _____85
Figure 26 : Représentation schématique du plasmide pGWB2-GW _____86
Figure 27 : Schéma représentatif de la ligation dans le pCR8 _____103
Figure 28 : Etapes conduisant au clonage du gène d'intérêt dans le pET28b_____104
Figure 29 : Représentation schématique du clonage en système binaire. _____105
Figure 30 : Arbre phylogénétique des séquences candidates avec des membres représentatifs des acyltransférases de la famille des BAHD _____129

Figure 31 : Alignement des séquences codant pour des HCT et des HQT avec des membres représentatifs de la famille des acyltransférases BAHD _____ 134
Figure 32 : Alignement des séquences protéiques candidates Ib3 à Ib12 avec des membres représentatifs de la famille des BAHD _____ 136
Figure 33 : Photographies des racines d'Ipomoea batatas cultivées en aéroponie _____ 139
Figure 34 : Photographies des parties aériennes d'Ipomoea batatas _____ 141
Figure 35 : Chromatogramme à 330nm d'un extrait contenant de l'acide chlorogénique et du 3,5-DCQ _____ 142
Figure 36 : Teneurs en acide chlorogénique dans des extraits hydro-éthanoliques de racines lyophilisées d'ipomée. _____ 143
Figure 37 : Teneurs en acide 3,5-dicaféoyl-quinique dans des extraits hydro-éthanoliques de racines d'Ipomée. _____ 145
Figure 38 : Niveaux d'expression relative des gènes candidats issus de la banque d'ADNc de PAT et des gènes de la voie des phénylpropanoïdes dans les racines d'Ipomoea batatas. _ 147
Figure 39 : Profil d'expression des gènes IbHQT et IbHCBT dans les racines d'Ipomoea batatas _____ 149
Figure 40 : Vérification de l'insertion du gène d'intérêt après transformation d'E. coli. __ 151
Figure 41 : Alignement des séquences protéiques des HCT d'ipomée et celle de la Genbank _____ 152
Figure 42 : Alignement des séquences protéiques de la nouvelle et de l'ancienne séquence d'Ib9 _____ 153
Figure 43 : Réaction catalysée par la 4CL, p-coumarate CoA ligase : synthèse des esters de CoA _____ 157
Figure 44 : Suivi cinétique de la synthèse enzymatique du caféoyl-CoA au spectrophotomètre UV. _____ 158
Figure 45 : Photographies des produits formés à la fin de la réaction. _____ 159
Figure 46 : Caféoyl-CoA synthétisé par la 4CL. _____ 161
Figure 47 : p-coumaroyl-CoA synthétisé par la 4CL. _____ 162
Figure 48 : Cinnamoyl-CoA synthétisé par la 4CL. _____ 163
Figure 49 : Féruloyl-CoA synthétisé par la 4CL. _____ 164
Figure 50 : Vérification de l'expression des protéines recombinantes _____ 165
Figure 51 : Synthèse d'acide chlorogénique par l'HCT _____ 166
Figure 52 : Synthèse de 3,5-DCQ à partir d'acide chlorogénique _____ 167
Figure 53 : Séparation des protéines par SDS-PAGE sur les extraits obtenus avec les différents systèmes de purification et de concentration. _____ 169
Figure 54 : Etude cinétique de la formation de 3,5-DCQ et de la consommation d'acide chlorogénique en fonction du temps. _____ 171
Figure 55 : Effet du pH sur l'activité de synthèse de 3,5-DCQ et de consommation de l'acide chlorogénique par l'HCT d'Ipomée. _____ 172
Figure 56 : Détermination de la concentration en protéines _____ 172
Figure 57 : Synthèse de caféoyl-quinate par l'HCT d'ipomée _____ 173
Figure 58 : Synthèse de l'acide 3,5-dicaféoyl-quinique (3,5-DCQ) par l'HCT d'Ipomée. _ 175

Figure 59 : Synthèse de caféoyl-shikimate par l'HCT d'ipomée _____ 176
Figure 60 : Synthèse de p-coumaroyl-quinate par l'HCT d'ipomée _____ 177
Figure 61 : Spectres UV du produit P9 _____ 178
Figure 62 : Synthèse de p-coumaroyl-shikimate par l'HCT d'ipomée _____ 179
Figure 63 : Spectres MS et UV des produits formés par l'HCT après incubation en présence de p-coumaroyl-CoA et de shikimate _____ 180
Figure 64 : Synthèse de cinnamoyl-quinate par l'HCT d'ipomée _____ 181
Figure 65 : Synthèse de cinnamoyl-shikimate par l'HCT d'ipomée _____ 183
Figure 66 : Vérification de l'insertion du gène d'intérêt dans le plasmide pGWB2-GW __ 189
Figure 67 : Vérification de l'intégration du plasmide recombiné dans les Agrobactéries transformées. _____ 190
Figure 68 : Etapes de la transformation génétique de vitro plants de tabac via Agrobacterium tumefaciens _____ 190
Figure 69 : Sélection des plantes transformées par PCR _____ 192
Figure 70 : Sélection des plantes transformées par PCR. _____ 192
Figure 71 : Niveaux d'expression relative du gène d'intérêt (HCT) dans les tabacs transgéniques. _____ 194
Figure 72 : Teneurs en 3,5-DCQ dans les feuilles de tabac. _____ 195
Figure 73 : Teneurs en acide chlorogénique dans les tabacs transformés. _____ 196
Figure 74 : Teneurs en 3,5-DCQ et en acide chlorogénique dans des extraits de feuilles _ 197
Figure 75 : Photographies des cultures cellulaires incubées sans et avec acide chlorogénique _____ 199
Figure 76 : Vérification de l'expression des gènes au cours de la culture des cellules de tabacs transformés avec les gènes codant pour les HCT _____ 200
Figure 77 : Taux de croissance des cellules transgéniques déterminé à partir de la biomasse fraîche _____ 201
Figure 78 : Comparaison du taux de croissance des cellules cultivées avec ou sans azote. 202
Figure 79 : Teneurs en acide chlorogénique dans le milieu de culture _____ 204
Figure 80 : Teneur en 3,5-DCQ dans le milieu de culture _____ 205
Figure 81 : Teneurs en acide chlorogénique dans les cellules transformées. _____ 206
Figure 82 : Teneurs en 3,5-DCQ dans les cellules de tabac transgénique. _____ 207
Figure 83 : Effet des témoins solvants et du pH sur la croissance mycélienne de Botrytis cinerea et Phytophthora parasitica. _____ 211
Figure 84 : Courbe d'inhibition de la croissance de Botrytis cinerea _____ 213
Figure 85 : Croissance des hyphes de Botrytis cinerea sur un milieu PDA additionné de la molécule à des concentrations croissantes _____ 213
Figure 86 : Croissance des hyphes de Phytophthora parasitica sur un milieu V8 additionné de la molécule à des concentrations croissantes _____ 214
Figure 87 : Taux d'inhibition de la croissance fongique _____ 215
Figure 88 : Dommages causés par Botrytis cinerea sur les feuilles détachées de tabac. __ 216
Figure 89 : Teneurs en 3,5-DCQ dans les feuilles des tabacs utilisés pour le test d'infection avec Botrytis cinerea _____ 217

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: *Exemples de produits pharmaceutiques d'origine végétale à valeur commerciale* 24
Tableau 2 : *Classification des phénylpropanoïdes.* 35
Tableau 3 : *Les différents isomères d'acides caféoylquiniques* 45
Tableau 4 : *Les formes majoritaires de DCQ (acide dicaféoyl-quinique)* 46
Tableau 5 : *Exemples de familles de plantes médicinales et alimentaires contenant des acides caféoylquiniques et dérivés..* 48
Tableau 6 : *Exemples de propriétés biologiques conférées par les acides caféoylquiniques et dérivés.* 51
Tableau 7 : *Composition des engrais N.P.K dans les milieux de culture des ipomées.* 76
Tableau 8 : *Composition du milieu LB* 88
Tableau 9 : *Composition du milieu YEB (Yeast Extract Beef extract).* 88
Tableau 10 : *Liste des antibiotiques utilisés comme agents de sélection des bactéries* 89
Tableau 11 : *Composition des milieux de culture pour les espèces fongiques étudiées.* 89
Tableau 12 : *Amorces spécifiques des séquences candidates d'Ipomoea batatas pour le clonage dans les plasmides d'expression.* 94
Tableau 13 : *Amorces utilisées pour l'amplification des séquences codant pour les HCT de café et d'artichaut.* 95
Tableau 14 : *Amorces utilisées pour amplifier les fragments des gènes d'intérêt dans les ADNg des tabacs transgéniques.* 96
Tableau 15 : *Amorces utilisées pour les analyses de qPCR pour l'expression des gènes candidats chez Ipomoea batatas.* 97
Tableau 16 : *Amorces de qPCR spécifiques utilisées pour l'analyse de l'expression des gènes chez Ipomoea batatas.* 98
Tableau 17 : *Amorces de qPCR spécifiques des gènes de la voie des phénylpropanoïdes chez Ipomoea batatas.* 99
Tableau 18 : *Amorces spécifiques des gènes de référence et des gènes d'intérêt pour l'analyse de l'expression par qPCR.* 99
Tableau 19 : *Mode de préparation et conditions de PCR pour l'amplification des gènes et composition du mélange réactionnel.* 100
Tableau 20 : *Composition des solutions tampons utilisées pour la purification des protéines* 110
Tableau 21 : *Protocole de préparation du gel SDS-Page.* 113
Tableau 22 : *Composants ajoutés au milieu de base après stérilisation.* 115
Tableau 23 : *Composition des milieux utilisés pour la transformation génétique du tabac médiée par Agrobacterium tumefaciens.* 116
Tableau 24 : *Etapes de la transformation génétique du tabac via Agrobacterium tumefaciens* 117

Tableau 25 : *Liste des composés utilisés comme étalons ou substrats pour les analyses biochimiques et les tests d'incubation enzymatique* _____ *120*
Tableau 26 : *Composition des molécules tests et des témoins utilisés dans les tests anti-fongiques.* _____ *124*
Tableau 27 : *Comparaison par alignement BLAST de la séquence n°1 déterminée in silico chez Ipomoea batatas, avec d'autres séquences de HCT répertoriées dans la GenBank.* __ *130*
Tableau 28 : *Comparaison par alignement BLAST de la séquence n°2 identifiée in silico chez Ipomoea batatas avec d'autres séquences de HQT de la banque Genbank.* _____ *131*
Tableau 29 : *Etude prospective des molécules sur le marché.* _____ *156*
Tableau 30 : *Protocoles pour la synthèse des esters de CoA par la 4CL.* _____ *158*
Tableau 31 : *Concentrations déterminées avec la loi de Beer-Lambert* _____ *160*
Tableau 32 : *Concentrations des extraits protéiques récupérés sur chaque système de purification et de concentration.* _____ *170*
Tableau 33 : *Bilan de la synthèse des composés produits par l'HCT d'Ipomée recombinante.* _____ *186*

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : *Demande de brevet n°WO2013/17805 A1 intitulé « enzymes de bioconversion de l'acide chlorogénique en au moins un acide di-, tri-caféoylquinique ».* 265

Annexe 2 : *Protocole d'extraction des ARN totaux à partir de tissus végétaux selon le Kit « RNeasy Plant Mini Kit », Qiagen.* 266

Annexe 3 : *Protocole d'élimination de l'ADNg dans les ARN par un traitement à la DNAse.* 267

Annexe 4 : *Protocole d'extraction d'ADN génomique avec le kit « DNeasy Plant Mini Kit ».* 268

Annexe 5 : *Protocole d'extraction du plasmide bactérien avec le kit GenElute™ Plasmid Miniprep* 269

Annexe 6 : *Courbes d'amplification et courbes de fusion des amorces d'amplification des gènes de références par PCR en temps réel.* 270

Annexe 7 : *Courbes d'amplification et courbes de fusion des amorces d'amplification des gènes cibles par PCR en temps réel.* 271

Annexe 8 : *Courbes d'amplification et courbes de fusion des amorces d'amplification des gènes cibles par PCR en temps réel.* 272

Annexe 9 : *Transcription inverse en une seule étape avec le kit « SuperScript™ One-Step RT-PCR System » de Invitrogen, Thermofisher Scientific.* 273

Annexe 10 : *Mode opératoire d'extraction du fragment d'ADN d'intérêt à partir du gel d'agarose à l'aide du kit « MinElute™ Gel extraction » (Qiagen)* 274

Annexe 11 : *Composition du milieu MS x10 (Murashige et Skoog).* 275

Annexe 12 : *Liste des acyltransférases utilisées pour l'alignement et la construction de l'arbre phylogénétique avec les séquences candidates.* 276

Annexe 13 : *Chiffres de production de 3,5-DCQ dans les racines d'Ipomoea batatas obtenus chez PAT en 2015.* 277

ANNEXES

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
5 décembre 2013 (05.12.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/178705 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2013/061119

(22) Date de dépôt international :
29 mai 2013 (29.05.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1254938 29 mai 2012 (29.05.2012) FR

(71) Déposants : **PLANT ADVANCED TECHNOLOGIES PAT** [FR/FR]; 13 rue du Bois de la Champelle, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy (FR). **UNIVERSITE DE LORRAINE** [FR/FR]; 34 cours Léopold, F-54000 Nancy (FR).

(72) Inventeurs : **MENIN, Barbara**; 2/3, Via 13 Marzo, I-1821 Vico Canavese (To) (IT). **DURIOT, Léonor**; 58 rue du Gal Custine, F-54000 Nancy (FR). **HEHN, Alain**; 480 rue Salvador Allende, F-54230 Neuves-maisons (FR). **BOURGAUD, Frédéric**; 81 Avenue Jean Jaurès, F-54500 Vandoeuvre Les Nancy (FR).

(74) Mandataire : **REGIMBEAU**; 20 rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

WO 2013/178705 A1

(54) **Title** : ENZYMES FOR THE BIOCONVERSION OF CHLOROGENIC ACID INTO AT LEAST ONE DI-, TRI- OR TETRA-CAFFEOYLQUINIC ACID

(54) **Titre** : ENZYMES DE BIOCONVERSION DE L'ACIDE CHROLOGENIQUE EN AU MOINS UN ACIDE DI-, TRI- OU TETRA-CAFEOYLQUINIQUE

(57) **Abstract** : The present invention concerns proteins capable of converting chlorogenic acid into at least one di-, tri- or tetra-caffeoylquinic acid, comprising a sequence of amino acids chosen from SEQ ID NO:33 and SEQ ID NO:8 to SEQ ID NO:18, sequences homologous to these specific sequences, or fragments of such sequences that retain the activity of converting chlorogenic acid into at least one di-, tri- or tetra-caffeoylquinic acid. It also concerns isolated nucleic acid molecules coding for such proteins, and expression vectors of these sequences, host cells and transgenic plants. It further concerns the use of these proteins, expression vectors, host cells or transgenic plants to convert chlorogenic acid into at least one di-, tri- or tetra-caffeoylquinic acid, and various methods of producing at least one di-, tri- or tetra-caffeoylquinic acid from chlorogenic acid.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne des protéines capables de convertir l'acide chlorogénique en au moins un acide di-, tri- ou tétra-caféoylquinique, comprenant une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO:33 et SEQ ID NO:8à SEQ ID NO:18, des séquences homologues à ces séquences spécifiques, ou des fragments de telles séquences conservant l'activité de conversion de l'acide chlorogénique en au moins un acide di-, tri-ou tétra-caféoylquinique. Elle concerne également des molécules d'acide nucléique isolées codant pour de telles protéines, ainsi que des vecteurs d'expression de ces séquences, des cellules hôtes, et des plantes transgéniques. Elle concerne en outre l'utilisation de ces protéines, vecteurs d'expression, cellules hôtes, ou plantes transgéniques pour convertir de l'acide chlorogénique en au moins un acide di-, tri-ou tétra-caféoylquinique, ainsi que différents procédés de production d'au moins un acide di-, tri-ou tétra-caféoylquinique à partir d'acide chlorogénique.

Annexe 1 : Demande de brevet n°WO2013/17805 A1 intitulé « enzymes de bioconversion de l'acide chlorogénique en au moins un acide di-, tri-caféoylquinique ».

Extraction des ARN totaux de tissus végétaux avec le kit « RNeasy Plant Mini Kit »
(74903 ; Qiagen, Courtaboeuf, France)

Le mode opératoire est le suivant :

- Broyer à l'azote liquide un maximum de 100 mg de matériel végétal avec un mortier et un pilon. Transférer la poudre dans un tube Eppendorf congelé et placer le tube dans la glace sans décongeler les tissus.

Les opérations suivantes s'effectuent à température ambiante. Toutes les étapes de centrifugation sont réalisées à température ambiante à 10 000 rpm.

- Ajouter 450 µL du tampon de lyse RLT additionné de 4,5µL de β-mercaptoethanol et vortexer vigoureusement.

- Transférer le lysat sur une colonne de filtration QIAshredder insérée dans un tube de collection de 2 mL. Centrifuger 2 minutes à vitesse maximale (13200 rpm). Transférer le filtrat dans un tube Eppendorf de 1,5 mL sans prélever le culot de débris.

- Ajouter 0,5 volume d'éthanol (96-100%) et mélanger par refoulement avec la pipette.

- Charger le volume total sur la colonne RNeasy Mini spin qui retient l'ARN.

- Centrifuger pendant 15 secondes. Eliminer le filtrat.

- Déposer 700µl avec le tampon de lavage RW1 sur la colonne et centrifuger 15 secondes à 10000 rpm pour éliminer les contaminants. Jeter le filtrat.

- Ajouter 500 µL de tampon RPE sur la colonne et centrifuger 15 secondes. Eliminer le filtrat.

- Renouveler ce lavage et centrifuger pendant 2 minutes.

- Changer de tube de collection et centrifuger pendant 1 minute.

- Mettre la colonne dans un Ependrof de 1,5 mL neuf.

- Déposer au centre du filtre 50 µL d'eau RNase Free et laisser agir 2 minutes.

- Centrifuger pendant 1 minute pour l'éluer l'ARN.

- Vérifier la qualité des ARN sur gel d'agarose et réaliser un dosage.

- Laisser l'ARN dans la glace s'il est utilisé immédiatement ou conserver l'échantillon à 80°C.

Annexe 2 : Protocole d'extraction des ARN totaux à partir de tissus végétaux selon le Kit « RNeasy Plant Mini Kit », Qiagen.

Elimination de l'ADNg par digestion à la DNAse : Kit TURBO DNA-FreeTM

(AM1907, Ambion, Life technologies, Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Mode opératoire :

Dans le tube d'ARN, ajouter 0,1 volume de tampon TURBO DNase 10x et 1 µL de DNAse.

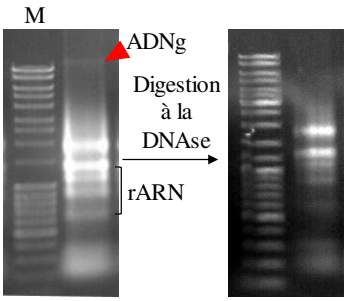
- Homogénéiser délicatement.

- Incuber à 37°C pendant 20-30 minutes.

- Ajouter 0,1 volume du réactif d'inhibition de la DNAse et mélanger.

- Laisser agir pendant 5 minutes à température ambiante.

- Centrifuger pendant 1,5 minutes à température ambiante à 10000 rpm et transférer les ARN dans un nouveau tube en évitant de décoller le culot d'ADN.



- Vérifier sur gel d'agarose l'absence de traces d'ADN.

Annexe 3 : Protocole d'élimination de l'ADNg dans les ARN par un traitement à la DNAse.

Extraction d'ADN génomique avec le Kit « DNeasy Plant Mini Kit »

(69104, Qiagen, Courtaboeuf, France)

Mode opératoire :

Toutes les étapes de centrifugation sont réalisées à température ambiante.

- Aux 100 mg de poudre de tissus broyés dans l'azote liquide, ajouter 400 µL de tampon AP1 et 4 µL de RNase A.

- Incuber pendant 10 minute à 65°C en retournant de 2 à 3 fois le tube.

- Ajouter 130 µL de tampon P3, mélanger et incuber pendant 5 minutes sur la glace.

- Centrifuger le lysat pendant 5 minutes à 13200 rpm.

- Transférer le surnageant dans une colonne QIAshredder insérée dans un tube de collection de 2 mL. Centrifuger à vitesse maximale pendant 2 minutes.

- Prélever le filtrat et le mettre dans un nouveau tube sans toucher le culot.

- Ajouter 1,5 volumes de tampon AW1 et homogénéiser par pipetage.

- Transférer 650 µL du mélange dans une colonne DNEasy Mini spin placée sur un tube sur un tube de collection. Centrifuger pedant 1 minute à 8000 rpm. Enlever le filtrat et répéter cette étape jusqu'à passage de tout le volume.

- Disposer la colonne dans un nouveau tube de collection et ajouter 500µL de tampon AW2 et centrifuger pendant 1 minute à 8000 rpm. Eliminer le surnageant et répéter le lavage. Centrifuger pendant 2 minutes à vitesse maximale.

- Changer de tube de collection et déposer 50 µL de tampon AE au centre de la colonne. Laisser agir pendant 5 minutes à température ambiante puis centrifuger pendant 1 minute à 8000 rpm pour l'élution. Renouveler cette dernière étape afin de récupérer tout l'ADN.

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN génomique avec le kit « DNeasy Plant Mini Kit ».

Extraction d'ADN plasmidique à partir de bactéries

GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (PLN350, Sigma-Aldrich)

Mode opératoire :

N.B : Les étapes de centrifugations sont programmées à vitesse maximale (12400xg).

- Centrifuger la culture bactérienne pendant 1 minute. Eliminer le surnageant.

- Ajouter au culot dans 200 µL de solution de resuspension additionnée de solution RNAse A. Homogénéiser au vortex.

- Rajouter 200 µL de solution de lyse et retourner immédiatement plusieurs fois le tube jusqu'à ce que le mélange devienne clair et visqueux.

- Précipiter les débris cellulaires en mettant 350 µL de solution de neutralisation. Mélanger par inversement du tube 4 à 6 fois. Centrifuger pendant 10 minutes.

- Insérer la colonne de liaison à l'ADN GenElute Miniprep dans un tube de collection. La conditionner avec 500 µL de solution de préparation et centrifuger 1 minute et jeter le filtrat.

- Déposer le lysat clarifié sur la colonne et centrifuger pendant 1 minute. Eliminer l'éluat liquide.

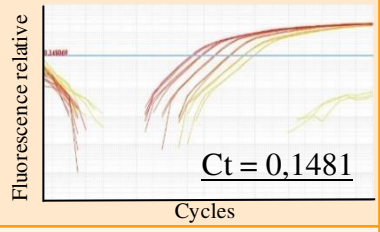
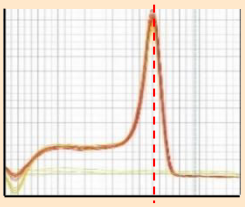
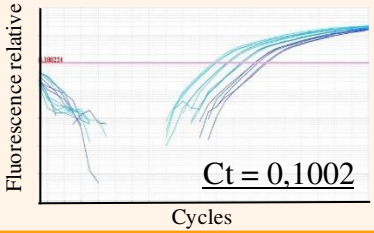
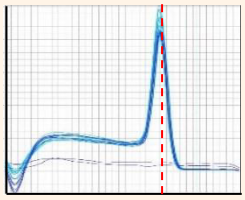
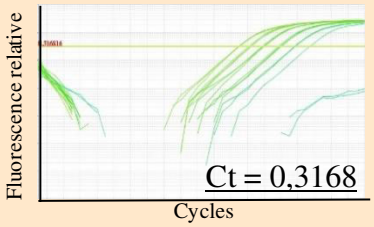
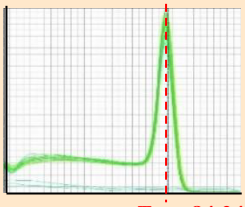
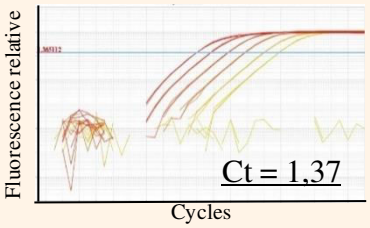
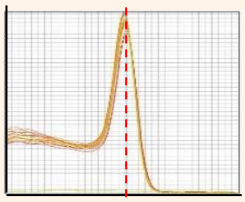
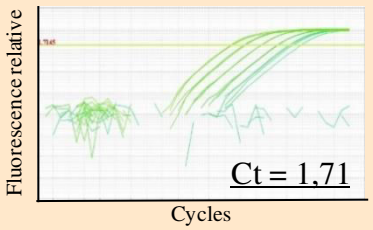
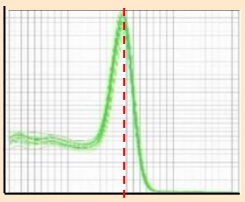
- Ajouter 500 µL de solution optionnelle sur la colonne et centrifuger pendant 1 minute et éliminer l'éluat.

- Ajouter 750 µL de solution de lavage et centrifuger la colonne pendant 1 minute. Jeter le liquide filtré en centrifuger de nouveau pendant 1 à 2 minutes afin d'éliminer le reste d'éthanol.

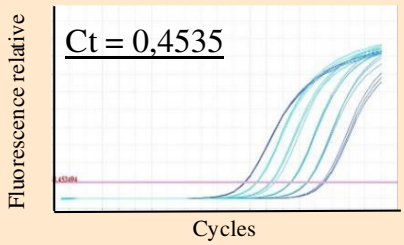
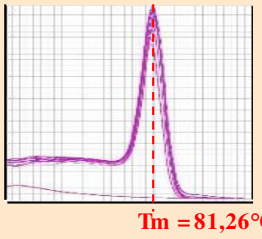
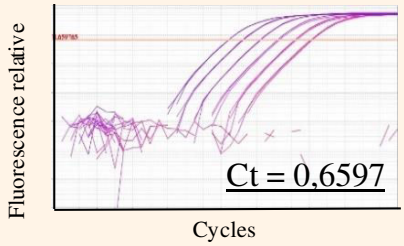
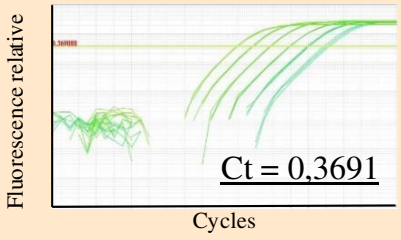
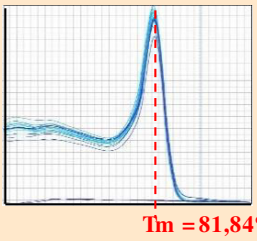
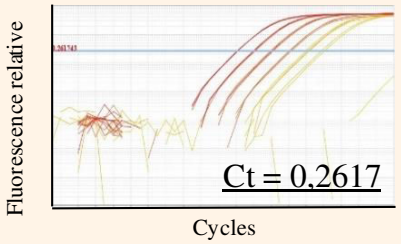
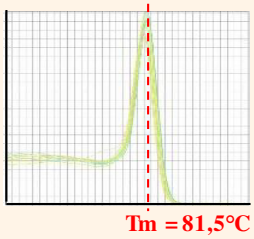
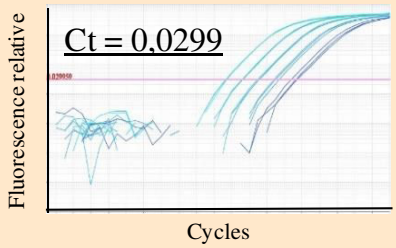
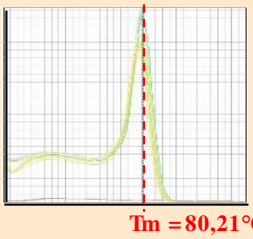
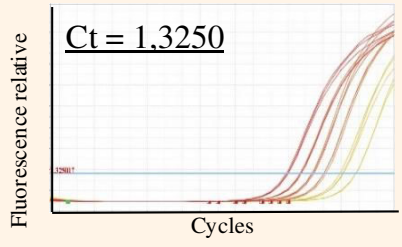
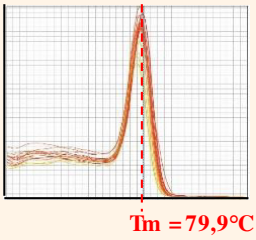
- Transférer la colonne sur un nouveau tube de collection. Ajouter 50 µL de solution d'élution au centre de la colonne. Laisser agir pendant 2 minutes puis centrifuger pendant 1 minute.

L'ADN plasmidique est présent dans l'éluat et peut être utilisé immédiatement ou stocké à -20°C.

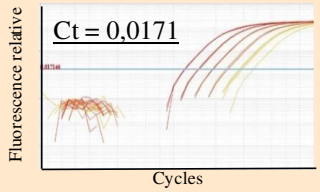
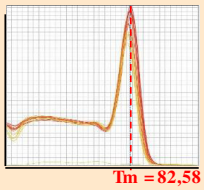
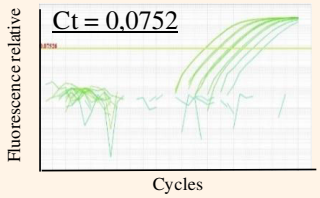
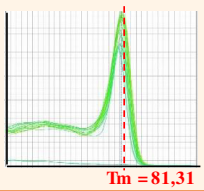
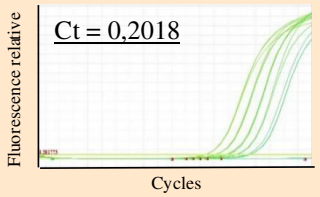
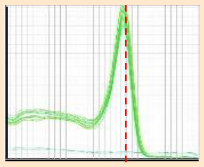
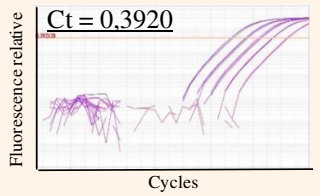
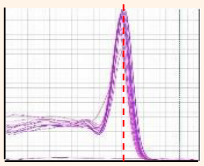
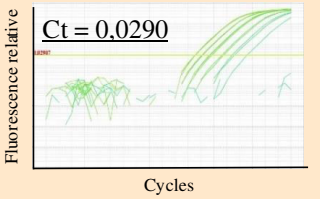
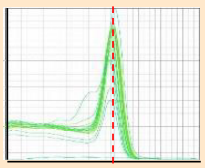
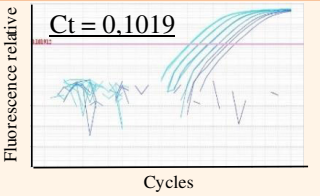
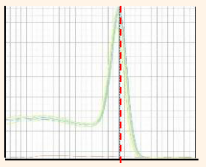
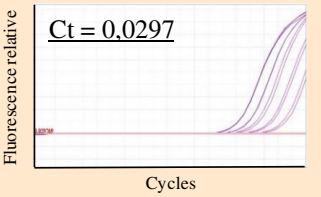
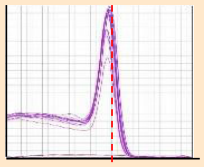
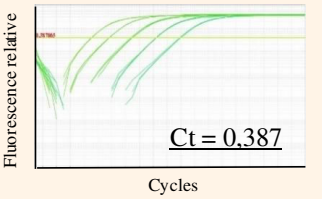
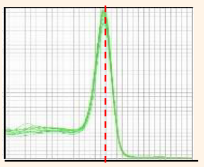
Annexe 5 : Protocole d'extraction du plasmide bactérien avec le kit GenElute™ Plasmid Miniprep, Sigma-Aldrich.

Gène	Courbe d'amplification	Courbe de fusion	Efficacité
IbARF			100%
IbRPL			100%
PLD			98%
EFα			100%
L25			100%

Annexe 6 : Courbes d'amplification et courbes de fusion des amorces d'amplification des gènes de références par PCR en temps réel.

Gène	Courbe d'amplification	Courbe de fusion	Efficacité
Ib4CL			96,5%
IbC4H			100%
IbHCT			100%
IbHQT			99,5%
Ib3			100%
Ib4			100%

Annexe 7 : Courbes d'amplification et courbes de fusion des amorces d'amplification des gènes cibles par PCR en temps réel.

Gène	Courbe d'amplification	Courbe de fusion	Efficacité
Ib5			99%
Ib6			99,6%
Ib7			100%
Ib8			100%
Ib9			100%
Ib10			100%
Ib11			100%
CcHCT			100%

Annexe 8 : Courbes d'amplification et courbes de fusion des amorces d'amplification des gènes cibles par PCR en temps réel.

La RT-PCR avec le kit « SuperScript™ One-Step RT-PCR System

(12574-018, InvitrogenTM, Thermofisher Scientific, Waltham, Massachussetts, USA)

Préparation du mélange réactionnel	Pour 50µL total: - 25µL de tampon Mix réactionnel 2x - 2µL ARN total (0,01 pg à 1µg) - 1µL de chaque amorce (Dir + rev) à 10µM - 1µL de SuperScript™ RT/Platinum Taq Mix - H_2O qsp 50µL.
Synthèse de l'ADNc	- Incubation à 55°C pendant 30 minutes
Amplification du fragment d'ADNc par PCR	1) Dénaturation de 2 min à 94°C 2) 40 cycles d'amplification comprenant: - Dénaturation de 15sec à 94°C - Hybridation de 30 sec au Tm des amorces - Elongation de 1min/kb à 68°C 3) Elongation finale à 68°C pendant 5 minutes.

Annexe 9 : Transcription inverse en une seule étape avec le kit « SuperScript™ One-Step RT-PCR System » de Invitrogen, Thermofisher Scientific.

Extraction du gène d'intérêt à partir du gel d'agarose : kit « MinElute™ PCR purification »

(28004, Qiagen).

Les étapes d'extraction se déroulent à température ambiante et les centrifugations s'effectuent à vitesse maximale (13200 rpm) à température ambiante.

Ce kit est utilisé pour extraire et purifier des fragments d'ADN d'une taille comprise entre 700 pb et 4 kb.

- Exciser le fragment d'ADN d'intérêt du gel sous lampe UV et le mettre dans un tube Eppendorf de 2 mL.

- Peser le fragment et y ajouter 3 volumes de tampon QG pour un volume de gel (100µL pour 100 mg de gel).

- Incuber à 50°C pendant 10 min en retournant de temps en temps le tube jusqu'à dissolution totale du gel.

La couleur du mélange doit rester jaune. Si le mélange est de couleur orange ou pourpre, ajouter 10µL d'acétate de sodium 3M, pH5 pour que la couleur redevienne jaune. L'ADN est absorbé efficacement lorsque le pH est ≤ 7,5. Le tampon QG contient un indicateur de pH qui permet de déterminer facilement si le pH varie.

- Ajouter ensuite un volume gel d'isopropanol froid à l'échantillon et homogénéiser par inversement du tube plusieurs fois.

- Insérer la colonne MinElute et déposer 800µL du gel en solution et centrifuger pendant 1 min. L'ADN va être retenu par la colonne. Jeter le filtrat et recommencer l'opération avec le liquide restant.

- Laver la colonne avec 500 µL de tampon QG sur la colonne et centrifuger pendant 1 min. Eliminer le surnageant et replacer la colonne sur le même tube. Renouveler l'opération avec 750µL de tampon QG et éliminer le surnageant.

- Laver la colonne avec 750µL de tampon PE contenant de l'éthanol. Centrifuger pendant 1 min pour se débarrasser de l'éthanol résiduel.

Si l'ADN est destiné à des applications sensibles au sels, comme la ligation à bout franc ou le séquençage, laisser agir durant 2-5min avant de centrifuger.

- Placer la colonne sur un tube de centrifugation de 1,5mL neuf.

- Pour éluer l'ADN, déposer au centre de la colonne 10µL de tampon EB (10mM Tris-HCl, pH 8,5) ou de l'eau nucléase-free stérile. Laisser reposer la colonne pendant 10min puis centrifuger pendant 1 min.

Annexe 10 : Mode opératoire d'extraction du fragment d'ADN d'intérêt à partir du gel d'agarose à l'aide du kit « MinElute™ Gel extraction » (Qiagen)

	Composé	Concentration (mg/L)
Macro-éléments non azotés	$CaCl_2$, $2H_2O$ $MgSO_4$, $7H_2O$ KH_2PO_4	440 180,54 170 20
Macro-éléments azotés	NH_4NO_3 KNO_3	1650 1900
Micro-éléments	KI H_3BO_3 $MnSO_4$, H_2O $ZnSO_4$, $7H_2O$ Na_2MoO_4,$2H_2O$ $CuSO_4$, $5H_2O$ $CoCl_2$, $6H_2O$	0,83 6,2 16,9 8,6 0,25 0,025 0,025
Fer	$FeSO_4$, $7H_2O$ Na_2EDTA	2780 3730
Agar (si milieu solide)		7,5g/L

Annexe 11 : Composition du milieu MS x10 (Murashige et Skoog).

Nom de l'acyltransférase/ espèce végétale/ N° accession sur GenBank	Donneur d'acyl-CoA	Produits majeurs	Références
Clade I Gt5AT (*Gentiana trifolia*); BAA74428 Dv3MAT (*Dahlia variabilis*); AAO12206	Hydroxy-cinnamoyl malonyl	Anthocyanines	Fujiwara *et al*, 1998. Suzuki *et al*, 2002
Clade II AtCER2 (*Arabidopsis thaliana*); AAM64817 ZmGlossy2 (*Zea mayz*); CAA61258	Inconnu	Cires épi-cuticulaires C30	Negruk *et al*, 1996; Xia *et al*, 1996 Tacke *et al*, 1995
Clade III RsVs (*Rauvolfia serpentina);* CAD89104 CbBEAT (*Clarkia breweri*); AAN48360	Acétyl	Vinorine Benzylbenzoate	Bayer *et al*, 2004 D'auria *et al*, 2002
Clade IV HvACT (*Hordeum vulgare);* AAO73071 AT1 (*Nicotiana attenuata*); AET80688	Hydroxy-cinnamoyl	esters d'agmatine putrescine	Burhenne *et al*, 2003 Onkonkesung *et al*, 2012
Clade Va NtHCBT (*Nicotiana tabacum*); AAN09798 DcHCBT2 (*Dianthus caryophillus*); O23917 IbHCBT (*Ipomoea batatas*). BAA87043 SpAAT1 (*Solanum penellii*); NP_001310384 AsHHT1 (*Avena sativa*); BAC78633 OsHCT4 (*Oryza sativa*). NP_001057003 CbRAS (*Coleus blumei*); A0PDV5 LaAAT1 (*Lavandula augustifolia*); ABI48360	Hydroxy-cinnamoyl/ Benzoyl Acétyl	Esters volatiles Anthranilates inconnu Esters volatiles Avénanthramides *p*-coumaroyl-, caféoyl-shikimate DAC, DACo	D'auria *et al*, 2002 Yang *et al*, 1997 Tanaka *et al*, 2010 Goulet *et al*, 2014 Yang *et al*, 2004 Kim *et al*, 2012 Berger *et al*, 2006 Landmann *et al*, 2011
Clade Vb CcHCT (*Coffea canephora*); AB047805 CyHCT (*Cynara cardunculus);* AAZ80046 NtHCT (*Nicotiana tabacum*); CAD47830 TpHCT1 (*Trifolium pratense*); ID: ACI28534 CbHCT2 (*Coleus blumei*); CBI83579 AtHCT (*Arabidopsis thaliana*); NP_199704;1 SbHCT (*Sorghum bicolor*); EES05411.1 PgHCT (*Platycodon grandifolium*); AEM636675 MtHCT (*Medicago truncatula*); XP_013454529 PvHCT1 (*Panicum vergatum*); AFY17066 CsHCT (*Cucumis sativus*); NP_001295843.1 IbHCT (*Ipomoea batatas*). BAJ14794 EcHQT (*Erythroxylum coca*); AFF19203 IbHQT (*Ipomoea batatas*). BAJ14795 StHQT (*Solanum toberosum*); ABA46756 LjHQT (*Lonicera japonica*); ACZ52698 SlHQT (*Solanum lycopersicum*); NP_001234850 CyHQT (*Cynara cardunculus*); ABK79690 CsHQT1 (*Cy. var. scolymus*); ACF370772 CcHQT (*Coffea canephora*). ABO77957 NtHQT (*Nicotiana tabacum*). CAE46932	Hydroxy-cinnamoyl	CGA, 3,5-DCQ, ES, EQ CGA, ES, EQ CGA, ES, EQ CGA, ES, EQ ES ES ES Inconnu *p*-coumaroylshikimate CGA, ES, EQ *p*-coumaroylshikimate inconnu EQ inconnu CGA, EQ CGA, EQ CGA, DCQs, EQ CGA, EQ CGA, EQ EQ, CGA, 3,5-DCQ CGA, EQ	Lepelley *et al*, 2007; Lallemand *et al*, 2012 Comino *et al*, 2007 Hoffmann *et al*, 2003 Sullivan *et al*, 2009 Sander *et al*, 2011 Hoffmann *et al*, 2004 Walker *et al*, 2013 Tuan *et al*, 2014 Shadle *et al*, 2007 Escamilla *et al*, 2014 Varbanova *et al*, 2011 Tanaka *et al*, 2010 Torre *et al*, 2013 Tanaka *et al*, 2010 Payyavula *et al*, 2015 Peng *et al*, 2010 Niggeweg *et al*, 2004, Moglia *et al*, 2014 Comino *et al*, 2009 Sonnante *et al*, 2010 Lallemand *et al*, 2012 Niggeweg *et al*, 2004, Hoffmann *et al*, 2003
EcATA (*Escherichia coli*). NP_312354		inconnu	Yokoyama *et al*, 2000

Annexe 12 : Liste des acyltransférases utilisées pour l'alignement et la construction de l'arbre phylogénétique avec les séquences candidates. CGA : acide chlorogénique ; EQ : esters de

quinate ; ES : esters de shikimate ; DCQ : acide dicaféoylquinique ; DACs : dérivés d'acides caféiques ; DACo : dérivés d'acide coumarique.

Date du prélèvement	Code culture et code production	**Teneur en DCQ mg/L (STD= PAT0010)**	**Soit % MS (g DCQ/100g de MS)**
15/06/2015	C0014, OF0048 Stimulation	274,9	2,7
20/07/2015	C0014, OF0052 Stimulation	452,7	4,5
	C0014, OF0052 Stimulation	205,3	2,1
30/07/15	C0014, OF0052 Stimulation	190,6	1,9
24/08 et 02/09	C0014, OF0057 Stimulation	318,2	3,2
	OF0057 Stimulation	30,9	0,3
	OF0057 Stimulation	411,2	4,1
28/09/2015	C0014, OF0063 Stimulation	329,0	3,3
05/10/15	C0014, OF0063 Stimulation	301,2	3,0
12/10/15	C0014, OF0063 Stimulation	391,9	3,9
09/11/2015	C0014, OF0070 Stimulation	254,6	2,5
	C0014, OF0070 Stimulation	183,5	1,8
	C0014, OF0070 Stimulation	329,9	3,3

Annexe 13 : Chiffres de production de 3,5-DCQ dans les racines d'Ipomoea batatas obtenus chez PAT en 2015.

Caractérisation moléculaire et enzymatique d'une HCT impliquée dans la biosynthèse de dérivés d'acide caféoyl-quinique chez *Ipomoea batatas*

Spécialisée dans la production d'actifs végétaux, l'entreprise PAT développe une activité innovante de recherche qui consiste à produire ou à modifier par voie enzymatique, des molécules présentes naturellement dans les plantes. L'espèce *Ipomoea batatas* contient de nombreux dérivés d'acide caféoyl-quinique dont majoritairement du 3,5-dicaféoyl-quinique (3,5-DCQ), une molécule antioxydante très recherchée en cosmétique. Cependant, la voie de biosynthèse est assez méconnue pour pouvoir exploiter les gènes d'intérêt par des approches d'ingénierie métabolique en vue d'augmenter la production.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont porté sur l'identification et la caractérisation fonctionnelle d'une hydroxycinnamoyl transférase (HCT) en vue d'augmenter la production de 3,5-DCQ soit en micro-organismes soit dans des plantes recombinantes.

Pour réaliser ces travaux, une banque de données RNAseq a été générée permettant ainsi d'accéder à des séquences codantes. Ces séquences ont été analysées par alignement avec des séquences codant pour des hydroxycinnamoyl transférases (HCT, HQT) impliquées dans la synthèse d'un précurseur potentiel, l'acide chlorogénique. Un premier tri a été mené en utilisant des approches d'expression différentielle de gènes. La fonction des gènes a été étudiée par des approches d'expression hétérologue en système bactérien et de transgénèse végétale. La production des métabolites cibles a été analysée dans des plantes transgéniques et dans des cultures cellulaires. Sur ces plantes, nous avons réalisé des tests de résistance à des pathogènes fongiques.

Nous avons identifié une HCT qui partage 85% d'identité avec une HCT de café impliquée dans la synthèse de 3,5-DCQ. Cette activité a pu être démontrée *in vitro* pour l'HCT d'ipomée. De plus, l'expression du gène codant pour l'HCT conduit à une surproduction de 3,5-DCQ dans les cultures cellulaires de tabacs exprimant les HCT. Cette molécule inhibe la croissance de *Botrytis cinerea* et de *Phytophthora parasitica*.

Compte tenu des teneurs en 3,5-DCQ très faibles par rapport à la plante d'origine, ces résultats suggèrent l'implication d'autres gènes dans cette voie de biosynthèse. L'activité antifongique du 3,5-DCQ pourrait être exploitée pour des applications agrochimiques.

Mots clés : *Ipomoea batatas*, HCT, acyltransférase, DCQ, acide chlorogénique, expression hétérologue, transgénèse végétale, culture cellulaire.

Molecular and enzymatic characterization of an HCT involved in the biosynthesis of caffeoylquinic acid derivatives in *Ipomoea batatas*.

Specialized in the production of plant actives, the company PAT develops an innovate research activity that consists of producing or modifying by enzymatic pathway, molecules naturally present in plants. The species *Ipomoea batatas* contains numerous caffeoylquinic acid derivatives, predominantly 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQ), an antioxydant molecule arousing interest in cosmetics. However, biosynthesis pathway of this molecule is poorly established in order to exploit the genes of interest by metabolic engineering approaches to increase the production.

The work realized in the frame of this PhD concerns the identification and functional characterization of a hydroxycinnamoyl transferase (HCT) in order to increase the production of 3,5-DCQ either in microorganisms or in recombinant plants.

To perform this work, an RNAseq databank was generated allowing to access to coding sequences. These sequences were analysed by alignment of sequences encoding for hydroxycinnamoyl transferases (HCT, HQT) involved in the biosynthesis of a potential precursor, chlorogenic acid. A first screening was performed by utilizing an approach of differential expression of genes. The function of genes was studied by heterologous expression in bacterial systems and by plant transgenesis approaches. The production of target metabolites was analyzed in transgenic plants and cell cultures. On these plants, we conducted tests of resistance to fungal pathogens.

We identified an HCT that shares 85% of identity with a HCT isolated from coffee previously characterized in 3,5-DCQ biosynthesis. This activity was shown *in vitro* for HCT of Ipomee. Moreover, the expression of target gene led to an overproduction of 3,5-DCQ in cell cultures of tobacco expressing HCT. This molecule inhibits growth of *Botrytis cinerea* and *Phytophthora parasitica*.

Giving that amounts of 3,5-DCQ are very low compared to the plant of origin, these results suggest the involvement of other genes in this biosynthesis pathway. Antifungal activity of 3,5-DCQ could be exploited for agrochimic applications.

Key words: *Ipomoea batatas*, HCT, acyltransferase, DCQ, chlorogenic acid, heterologous expression, transgenesis, cell culture.