



## 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-memoires-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-memoires-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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**2015-2016**

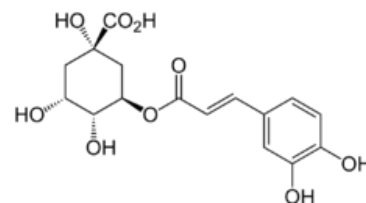
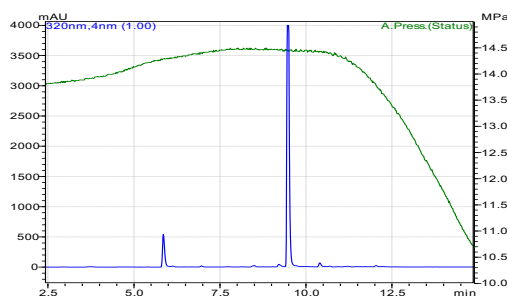
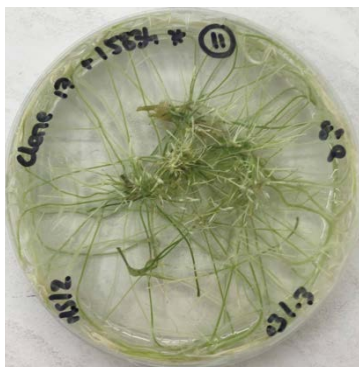
## MASTER FAGE

Biologie et Ecologie pour la forêt,  
L'Agronomie et l'Environnement

Spécialité :

Biologie intégrative de l'arbre et des plantes cultivées

**Surexpression d'un gène (*sht1*) codant pour une  
SpermidineHydroxycinnamoylTransférase dans des souches  
transformées de chevelus racinaires de chicorée. Etude biochimique  
et transcriptomique.**



**BERNARD Guillaume**

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 05/09/2016

Maitre de stage : RAMBAUD Caroline maitre de conférence  
Institut Charles Viollette

# Remerciements

*Je remercie le professeur Jean Louis HILBERT pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe ASQV et pour l'attention porté à mes travaux.*

*Un grand merci à mon maître de stage Caroline RAMBAUD, pour m'avoir conseillé et guidé tout au long de mon stage. Merci pour sa bonne humeur quotidienne et ses nombreuses relectures.*

*Un immense merci à Marianne DELPORTE pour son aide, ses conseils avisés, nos discussions sur nos sujets de recherches, mais aussi pour m'avoir appris à faire fonctionner l'HPLC à laquelle elle est très attachée, ainsi que de m'avoir fait confiance quand je l'utilisais sans elle.*

*Un grand merci à Harmony pour m'avoir fait découvrir le laboratoire à mon arrivé et tout au long de mon stage lorsque je cherchais quelque chose, ainsi que d'avoir pris soin de mes cultures de hairy roots.*

*Je remercie également tout ceux avec qui j'ai pu partager de longues et plaisantes discussions durant les repas du midi, Thierry, David et Nasser.*

*Et pour finir, merci à l'ensemble du personnel du laboratoire pour leur accueil.*

## **Table des matières**

<b>Présentation de la structure d'accueil.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>I) Introduction.....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>II) Matériels et méthodes.....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>A) Matériel végétal.....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>B) Méthodes de culture des chevelus racinaires .....</b>	<b>- 7 -</b>
1) Culture des chevelus racinaires sur milieu solide .....	- 7 -
2) Culture des chevelus racinaires en milieu liquide .....	- 7 -
3) Elicitation par le méthyljasmonate .....	- 7 -
4) Elicitation par l'ergostérol.....	- 8 -
5) Culture en milieu additionné de spermidine .....	- 8 -
<b>C) Caractérisation moléculaire des chevelus racinaires .....</b>	<b>- 8 -</b>
1) Extraction des ADN .....	- 8 -
2) Analyses PCR .....	- 8 -
<b>D) Analyse de l'expression des gènes.....</b>	<b>- 9 -</b>
1) Extraction des ARN, contrôle de leur qualité, quantité, et synthèse des .....	- 9 -
ADNc.....	- 9 -
2) Conditions de la qPCR .....	- 9 -
3) Sélection des gènes de référence .....	- 10 -
4) Analyse de l'expression des gènes d'intérêt.....	- 10 -
5) Analyses statistiques.....	- 10 -
6) Conditions RT-PCR .....	- 10 -
<b>E) Caractérisation biochimique des chevelus racinaires .....</b>	<b>- 11 -</b>
1) Récolte et traitement des échantillons de chevelus racinaires .....	- 11 -
2) Elimination des sucres présents dans les milieux de cultures .....	- 11 -
3) Analyse HPLC.....	- 11 -
<b>III) Résultats et discussions.....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>A) Analyse de chevelus racinaires transformés avec <i>sht1</i> .....</b>	<b>- 12 -</b>
1) Caractéristiques morphologiques des chevelus racinaires .....	- 12 -
2) Caractérisation moléculaire des chevelus racinaires .....	- 13 -
3) Caractérisation biochimique des cultures chevelus racinaires .....	- 14 -
4) Analyses transcriptomiques des chevelus racinaires .....	- 16 -
5) Elicitations au Méthyljasmonate et ergostérol .....	- 16 -
6) Cultures avec spermidine.....	- 17 -
7) Analyse des milieux de culture .....	- 17 -
<b>B) Expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides hydroxycinnamiques .-</b>	<b>- 18 -</b>
1) Sélection des souches de chevelus racinaires et des gènes de référence .....	- 18 -
2) Evaluation de la stabilité d'expression des gènes de référence .....	- 19 -
3) Quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt .....	- 20 -
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>27</b>

# Abréviations

4CL : 4-coumaroylCoA ligase

ADNc : acide désoxyribonucleique complémentaire

ANOVA : analysis of variance

ARN : acide ribonucléique

C3H : p-coumaroyl ester 3-hydroxylase

CoA : coenzyme A

CQA : acide caféoylquinique  
(Acide chlorogénique)

Ct : threshold cycle (cycle seuil)

di-CQA : acide dicaféoylquinique  
(Acide isochlorogénique)

EUP : eau ultra pure

GFP : green fluorescent protein

HCT : hydroxycinnamoylCoA  
shikimate/quinate hydroxycinnamoyl  
transférase

HPLC : High Performance Liquid  
Chromatography

HQT : hydroxycinnamoylCoA  
quinate/shikimate hydroxycinnamoyl  
transférase

HR : hairy root

kD : kiloDalton

MeJa : méthyljasmonate

MSHR : Murashige et Skoog hairy roots

pRi : Plasmide rhizogénique

pTi : Plasmide tumorigénique

Pb : paire de bases

PCR : polymerase chain reaction

qPCR : PCR quantitative en temps réel

RT : rétrotranscriptase

## Présentation de la structure d'accueil.

### Equipe ASQV de l'institut Charles Viollette

L'équipe « Adaptation aux stress et qualité des végétaux » (ASQV) est en partie issue de l'UMR 1281 « Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés (SADV) qui fut créée en 2006. Cette unité dirigée par le Professeur Jean Louis Hilbert était composée de chercheurs du Centre INRA de Lille et de l'Université de Lille 1, Sciences et Technologies. Ses travaux étaient réalisés sur des espèces cultivées dans le Nord de la France comme la chicorée industrielle, le lin à fibres, le miscanthus et le pois protéagineux.

Dans le cadre de la contractualisation 2015-2019 l'équipe SADV a rejoint l'institut régional de recherche Charles Viollette qui est né d'une initiative conjointe des pôles de compétitivité Nutrition Santé Longévité et Aquimer ainsi que du pôle d'Excellence Agroalimentaire Agroé. L'institut dirigé par Pascal Dhulster rassemble sept laboratoires implantés sur sept établissements de la région Haut de France à savoir, polytech'Lille, IUT A, UFR de biologie, ISA, la faculté de pharmacie, ULCO/Capécure et l'Université d'Artois/Adrianor. L'ambition de l'institut est d'améliorer la qualité et la sécurité alimentaires de la « fourche » à la « fourchette » par le sourcing, la caractérisation, et la bio-production de molécules d'intérêt issues des filières naturelles. Pour cela il dispose de 3 équipes :

- L'équipe ProbioGEM (Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien), dont les champs d'activités sont l'élaboration de stratégies d'obtention de molécules bioactives ou de plateformes, et leurs mises en œuvre dans les bioprocédés.

- L'équipe QSA (qualité et sécurité des aliments) qui développe des méthodes et des concepts pour la sécurité alimentaire.

- L'équipe ASQV qui travaille sur l'anticipation de l'évolution des systèmes agricoles aux changements environnementaux ainsi que sur des productions végétales de qualité pour leur exploitation dans le domaine de l'alimentaire ou de la santé. Une des principales thématiques de recherche s'intéresse, grâce à des approches métabolomiques, biochimiques et transcriptomiques, aux voies de biosynthèse des métabolites secondaires de la famille des lactones sesquiterpéniques et des composés phénoliques présentant un profil d'accumulation particulier chez la chicorée industrielle. Les connaissances recueillies sont exploitées en partenariat avec les acteurs de la filière chicorée (Leroux, Florimond-Desprez) pour leurs programmes de sélection. Un de leurs projets représentatifs est le projet « QUALICHIC » qui est l'étude des propriétés organoleptiques et de la fonctionnalité des métabolites secondaires issus des chicorées industrielles.

## I) Introduction

Le genre *Cichorium* qui appartient à la famille des Astéracées regroupe six espèces dont la majeure partie est présente en Europe. *Cichorium intybus*, plus communément nommée « chicorée » fut historiquement cultivée par les Egyptiens comme plante médicinale. Au cours des âges, ses vertus thérapeutiques (activités hépatoprotectrice, antimicrobienne, antidiabétique, anti-inflammatoire et antioxydante) furent utilisées par de nombreux peuples qui consommaient, en fonction du mal à traiter, les racines, les bourgeons, les feuilles, les fleurs, voire même les graines, sous forme de décoctions, infusions ou de préparations alimentaires. De nos jours, elle est utilisée à des fins alimentaires comme par exemple dans le nord de la France où elle est consommée comme substitut du café, sous forme d'endive ou de salade. Mais ses capacités thérapeutiques sont encore exploitées dans de nombreux pays comme par exemple la Turquie, la Bulgarie etc... (Street et al. 2013). La chicorée tire ses activités médicinales de sa capacité à accumuler de nombreuses molécules notamment l'inuline, des fructanes prébiotiques, ainsi que de nombreux métabolites secondaires (Rasmussen et al. 2014).

Les métabolites secondaires ont pendant longtemps été considérés comme non essentiels car ils ne participaient pas directement aux mécanismes de croissance et de développement des plantes. Ce n'est qu'au milieu du vingtième siècle grâce à l'apparition de nouvelles techniques analytiques, comme par exemple la chromatographie et l'essor de la biologie moléculaire, qu'il a été clairement démontré que les métabolites secondaires jouaient un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à leur environnement (Bourgaud et al. 2001).

Ces métabolites font partie d'un ensemble très varié de molécules ayant des rôles très diversifiés : protection des plantes aux pathogènes (antibiotiques, antifongiques...), protection contre les plantes compétitives (molécules allélopathiques), protection contre les UV, pigmentation etc.

Les métabolites secondaires sont classés selon leurs voies de biosynthèse. Trois grandes familles de molécules se distinguent : les terpènes, produits par condensation d'unités isoprène ; les alcaloïdes, qui sont des molécules azotées ; et les composés phénoliques, construits à partir d'un noyau aromatique phényle possédant au moins un groupement hydroxyle (Kabera et al. 2014).

La chicorée possède la particularité d'accumuler dans ses racines deux esters d'acide caféique, l'acide chlorogénique (3-CQA) et l'acide isochlorogénique (3-5diCQA). Ces deux molécules sont des antioxydants qui exerceraient une forte activité inflammatoire sur la paroi endothéliale ce qui diminuerait les problèmes cardiovasculaires (Fuentes & Palomo 2014). Ils possèderaient également des propriétés cosmétologiques intéressantes (Zillich et al. 2015). Ces esters d'acide caféique font tous deux partie de la classe des acides hydroxycinnamiques qui sont une sous-classe des polyphénols. Les acides hydroxycinnamiques proviennent de l'acide *p*-coumarique et de son dérivé thioester le coumaroyl-CoA qui sont une plaque tournante du métabolisme des polyphénols chez les plantes. En effet, c'est à partir de là que vont s'initier trois voies de biosynthèses. Celle des coumarines qui sont souvent des phytoalexines, celle des flavonoïdes qui ont en majeure partie un rôle de défense contre les UV et celle des lignines (Inês et al. 2016). La voie de biosynthèse de la lignine fait intervenir celle des acides hydroxycinnamiques pour produire de l'acide caféique ou caféoyl-CoA qui sera par la suite catalysé en monolignols.

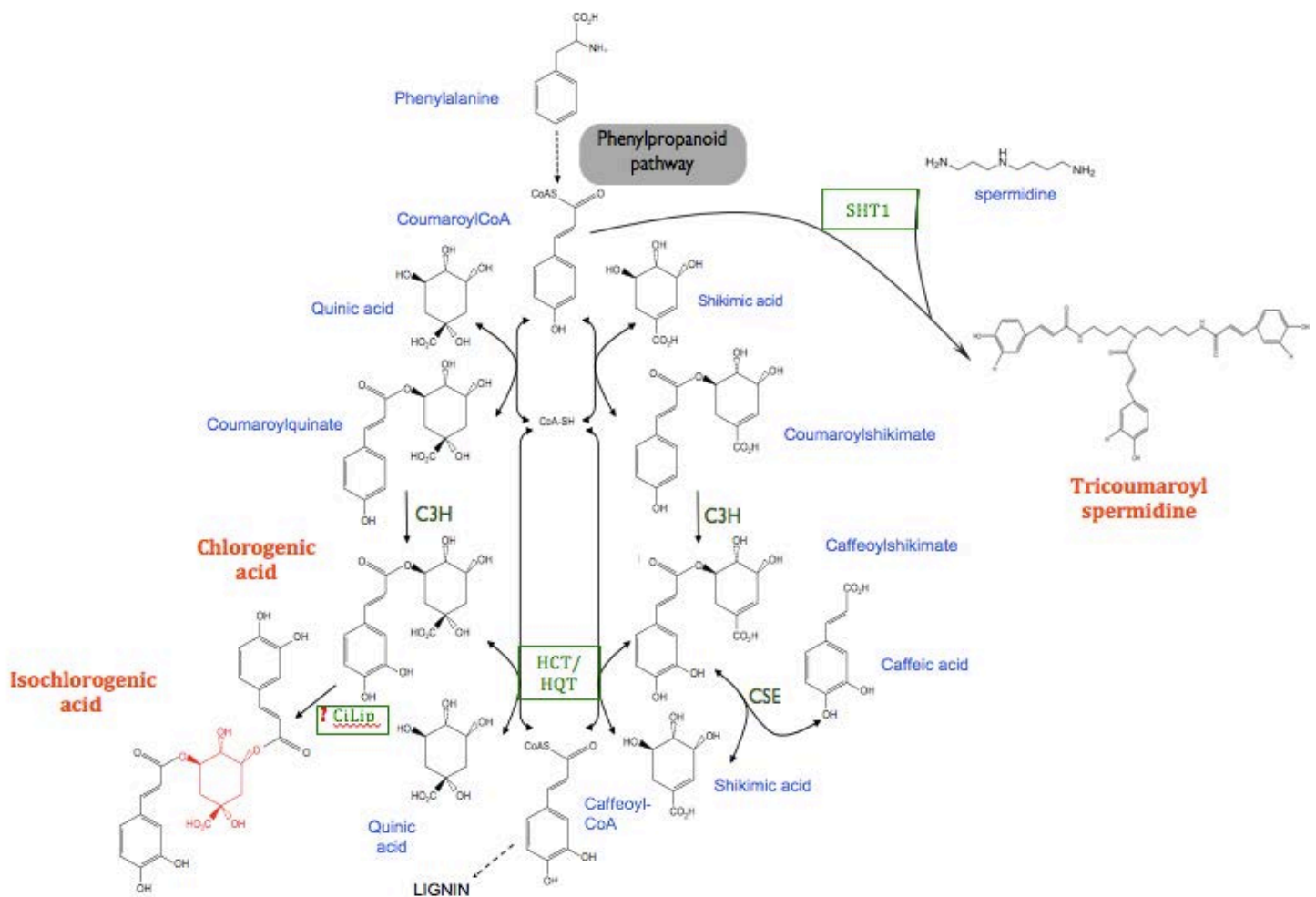


Figure 1 : Représentation de la voie métabolique impliquée dans la synthèse des 2 esters d'acide caféique co-accumulés de manière originale chez *C. intybus* ainsi que celle de la tricoumaroylspermidine grâce à l'enzyme SHT1. Le ? représente l'isochlorogénate synthase ou CiLip = Lipase candidate. (Source Mariane DELPORTE)

L'acide *p*-coumarique est un produit de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes qui est initiée par la phénylalanine. Cet acide aminé aromatique essentiel, est produit par la voie du shikimate alimenté soit en érythrose-4-p par la voie des pentoses phosphates, soit en phosphoénolpyruvate par la glycolyse. La phénylalanine, une fois synthétisée, emprunte la voie des phénylpropanoïdes proprement dite. Elle est catalysée en acide cinnamique grâce à la phénylalanine ammonialyase (PAL), qui est ensuite catalysée en acide *p*-coumarique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H), enzyme faisant partie de la famille des cytochrome P450. La dernière étape de cette voie est la catalyse de l'acide *p*-coumarique en coumaroyl-CoA grâce à la 4-hydroxyxinnamoyl-CoA ligase, réaction faisant intervenir un coenzyme A. L'expression de ces trois enzymes (celle de la PAL plus particulièrement) peut être induite par une infection, une blessure, une exposition aux UV, un stress hydrique. Toutefois, le génotype est également un déterminant majeur de la variation de la teneur en polyphénols dans la plante (Pandino et al. 2014).

La chicorée accumule le CQA qui est l'association d'un caféoyl-CoA avec un acide quinique. La voie de synthèse du CQA chez les végétaux est bien caractérisée, les enzymes impliquées sont des HCTs (hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransférases) et des HQTs (hydroxycinnamoyl-CoA quinate/shikimate



hydroxycinnamoyltransférases). Ces enzymes sont des acyltransférases, elles catalysent des réactions entre des thioesters de coenzyme A et une grande variété de molécules engagées dans les voies de biosynthèse de nombreux composés végétaux (Grienenberger et al. 2009). Chez la chicorée, 5 de ces enzymes (3 HQTs et 2 HCTs) ont été caractérisées récemment (Legrand et al. 2016). Les HCTs largement caractérisées chez de nombreuses plantes sembleraient plutôt être impliquées dans la voie de production des lignines. En revanche les HQTs, elles, seraient plutôt associées aux plantes accumulatrices de CQA (Lallemand et al. 2012). La production de CQA chez les plantes serait donc principalement initiée par la réaction d'estérification entre le p-coumaroyl-CoA et l'acide quinique grâce aux HQTs, pour donner du coumaroylquinone. Le coumaroylquinone, par la suite est hydroxylé sur le carbone 3 de son cycle benzénique grâce à l'action de la C3H, enzyme faisant partie de la famille des P450, pour *in fine* obtenir le CQA (Niggeweg et al. 2004). Or, chez la chicorée, la production de CQA nécessite la production de cafféoyl-CoA grâce aux HCTs, puis celui-ci est transformé en CQA grâce aux HQTs (Legrand et al. 2016). L'acide chlorogénique peut ensuite être converti en acide isochlorogénique ou di-CQA. Mais l'enzyme responsable de cette synthèse, l'isochlorogénate synthase (ICS) est encore très peu connue même si deux enzymes candidates proche des lipases ont été retenues par le Dr Legrand au sein du laboratoire.

Outre leur capacité à se lier à des acides, les esters de CoA peuvent aussi créer des liaisons avec des polyamines pour donner des composés nommés phénolamides. Les polyamines comme la putrescine, la spermine et la spermidine peuvent intervenir dans la division cellulaire ou la mise à fleur par exemple, mais peuvent aussi jouer un rôle dans la réponse en cas de stress abiotiques (Fellenberg et al. 2012).

En ce qui concerne les phénolamides, elles ont été retrouvées en quantité au niveau des organes reproducteurs de nombreuses plantes. Elles sont synthétisées au niveau du tapetum des anthères, puis sont déposées et accumulées au niveau de la surface des grains de pollen durant l'étape de mort cellulaire programmée du tapetum, au cours de la maturation des grains de pollen. Ces molécules sont dotées d'activité antimicrobienne, antifongique (Walters et al. 2001) ce qui présente un intérêt potentiel pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique voire même agronomique (biocontrôle). Les enzymes responsables de la formation des phénolamides sont des SHT, Spermine/Spermidine hydroxycinnamoyltransférases. Comme les HCTs/HQTs elles appartiennent à une famille d'enzymes particulières, la famille des BAHD. Ce nom leur vient des initiales des 4 premières enzymes caractérisées (**BEAT** : Benzylalcohol O-acétyltransférase, **AHCT** : Anthocyanin O-hydroxycinnamoyltransférase, **HCBT** : N-Hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase, **DAT** : Déacétylvindoline4-O-acétyltransférase). Ces enzymes sont des monomères compris entre 48 et 55kD qui partagent deux domaines conservés HXXXDG et DFGWG qui ont permis de les classer phylogénétiquement (D'Auria 2006).

Chez la chicorée, des phénolamides ont également été retrouvées au niveau des organes reproducteurs (Delporte communication personnelle). Deux gènes *sht* codant pour une spermidine hydroxycinnamoyltransférase (*sht1*) et pour une spermine hydroxycinnamoyltransférase (*sht2*), ainsi que deux *hct* et trois *hqt* sont en cours de caractérisation. Cependant tous ces gènes mis en évidence chez la chicorée nécessitent néanmoins que leurs fonctions putatives soient validées.

Pour la validation fonctionnelle d'un gène, l'ingénierie métabolique est souvent utilisée. Plusieurs techniques existent pour insérer un gène étranger dans une plante comme par exemple la biolistique qui utilise un « canon à ADN », l'électroporation ou la transformation par des bactéries telluriques GRAM négatif, *Agrobacterium tumefaciens* et

*Agrobacterium rhizogenes*. Chez la chicorée, la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* semble être difficile (Abid et al. 1995), la biolistique et l'électroporation n'ont jamais été utilisées, par contre la transformation par *Agrobacterium rhizogenes* est une méthode couramment employée pour l'étude des voies de biosynthèse des métabolites secondaires.

*Agrobacterium rhizogenes* est un ingénieur en génétique, naturel, connu depuis plus de trente ans, qui a la capacité de transférer un bout d'ADN plasmidique dans le génome d'une plante blessée dans le but de faire produire à celle-ci des molécules (opines) qui lui serviront de source d'énergie. En effet, il possède un plasmide nommé Ri, pour « roots inducing » d'environ 200kb, composé de deux parties essentielles nécessaires à la transformation génétique, la région *vir* et l'ADN de transfert ou T-DNA (cf figure 2).

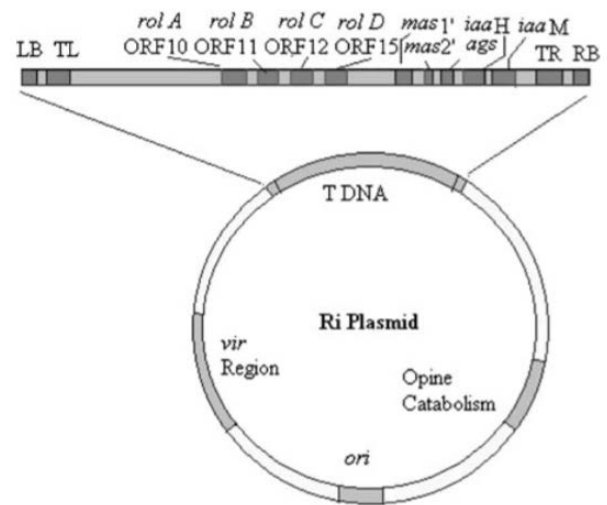


Figure 2 : Représentation du plasmide Ri et de son T-DNA (Source Chandra 2011)

Lorsqu'une plante est blessée, elle libère des composés phénoliques qui vont activer l'expression de la région *vir*. Les protéines synthétisées seront nécessaires à l'excision du T-DNA du plasmide, au transport et à son intégration dans le génome de la plante. Le T-DNA, fragment d'ADN d'environ 30kb, possède deux séquences très importantes à ses extrémités (LB = Left Border, RB = Right Border) qui sont les sites de reconnaissances des protéines VIR lors du phénomène d'excision. Il possède aussi les oncogènes (gènes *rolA* à *D*) qui sont responsables de la formation de chevelus racinaires (hairy roots) grâce à la mise en place de production d'auxines. Mais le rôle de ces gènes est encore mal connu. On pense qu'ils pourraient aussi intervenir dans la manipulation des voies de défense de la plante dans le but de lutter contre des pathogènes compétitifs (Bulgakov 2008); ce qui serait responsable de la forte production de métabolites secondaires par les chevelus racinaires. Le T-DNA est inséré aléatoirement dans le génome de la plante, sa recombinaison est illégitime du fait que son insertion se produit sur un seul brin d'ADN (Tzfira et al. 2004). L'expression du T-DNA dans le génome de la plante sera stable et l'information génétique sera transmise et exprimée par la descendance, une cellule ayant intégrée le T-DNA donnera donc une racine ayant le même génotype.

De ce fait, grâce à l'étude des phénomènes liés à la transgénése, la possibilité d'insérer des gènes dans de nombreuses plantes dans le but de les étudier a vu le jour. Pour introduire un gène d'intérêt dans le génome d'une plante celui-ci est inséré dans un vecteur binaire entre des séquences LB et RB. Le plasmide possédant le gène d'intérêt est ensuite transféré à *Agrobacterium rhizogenes*. L'agrobactérie possédera donc deux plasmides, le plasmide Ri ainsi que le vecteur binaire (Hellens et al. 2000). Ce sont donc les protéines de virulence du plasmide Ri qui permettront l'excision du gène d'intérêt, son transfert ainsi que son intégration dans le génome de la plante. Le T-DNA du plasmide Ri sera lui aussi inséré, il apportera les oncogènes et les gènes codant pour les auxines. De ce fait il y aura deux phénomènes de transport d'ADN, la possibilité d'échec de l'un ou l'autre étant possible, obtenir des chevelus racinaires n'ayant pas intégré le gène d'intérêt n'est donc pas négligeable. La capacité conférée par le T-DNA à produire des auxines permettra aux chevelus

racinaires une fois cultivés *in vitro* de se développer très rapidement sans nécessiter de régulateurs de croissance, ni de pesticides ce qui permettra une culture facile sur milieux gélosés ou en bioréacteurs.

Les chevelus racinaires sont étudiés depuis plus de 25 ans pour l'étude des voies de biosynthèse des métabolites secondaires, leur production ou la phytoremédiation. Les voies de biosynthèses des phénylpropanoïdes chez *Fagopyrum tataricum* (Thwe et al. 2016), du CQA et de nombreux autres polyphénols ont été étudiées grâce à la mise en place de chevelus racinaires (Liu et al. 2006), (Skala et al. 2015). Des expériences d'élicitations avec du méthyljasmonate (Malarz et al. 2007) ainsi que des éliciteurs fongiques ont aussi été menées pour voir leur influence sur les métabolites secondaires (Bais et al. 2003). Des gènes sous l'influence de promoteurs forts, comme par exemple le promoteur 35S permettant leur surexpression (Lindbo 2007), ont été insérés avec succès chez de nombreuses espèces comme la belladone (*Atropa belladonna*) (Yang et al. 2011). Chez la chicorée, des chevelus racinaires ont déjà été étudiés pour la mise en évidence de production d'esculine et esculetine (Bais et al. 2000), pour la synthèse d'inuline (Kusch et al 2009) ainsi que pour la production de coumarines en utilisant des éliciteurs fongiques (Bais et al 2000). Des travaux sur les acides hydroxycinnamiques ont aussi montré récemment une forte production de 3-CQA et de di-CQA chez des chevelus racinaires de chicorée (Malarz et al. 2013).

Cependant la technique de chevelus racinaires n'avait encore jamais été utilisée pour la surexpression de gènes d'intérêt chez la chicorée. C'est ce qui a été fait dans notre laboratoire où le gène de la *sht1*, gène potentiellement impliqué dans la production de tricoumaroylspermidine au cours de la production de pollen, a été introduit sous le promoteur 35S dans deux génotypes de chicorée grâce à *Agrobacterium rhizogenes*.

L'objectif de mon stage a donc été de caractériser ces souches de chevelus racinaires d'un point de vue morphologique, moléculaire et biochimique. Pour cela, des analyses PCR ont été effectuées dans le but de rechercher les gènes *rolB* et *virD2*, témoins du transfert du T-DNA du plasmide Ri, ainsi que rechercher le gène *sht1* témoin du transfert du T-DNA du vecteur binaire. Des dosages HPLC ont aussi été entrepris pour l'analyse des composés phénoliques plus particulièrement pour quantifier les acides hydroxycinnamiques et rechercher la présence de phénolamides.

Dans un second temps une analyse transcriptionnelle sur la voie des acides hydrocinnamiques a été réalisée pour mieux comprendre les mécanismes qui permettent la production accrue de ces molécules dans les chevelus racinaires.

## II) Matériels et méthodes.

### A) Matériel végétal

Les chevelus racinaires utilisés durant ce stage ont été mis en place par Raveschot Cyril lors de son stage de fin d'études de Master. Les agro-infections ont été réalisées avec deux souches (2659 et 15834) d'*Agrobacterium rhizogenes* sur de la chicorée industrielle (*Cichorium intybus L.*, *Asteraceae*). La variété commerciale Orchies et le clone 17, qui est le génotype de chicorée employée pour le re-séquençage de la chicorée (communication Thierry Cadalen), ont été utilisés. Vingt chevelus racinaires d'Orchies ont été sélectionnés après agro-infection avec la souche 2659. Dix chevelus racinaires d'Orchies ont été sélectionnés après agro-infection avec la souche 15834. Vingt chevelus racinaires de clone 17 ont été sélectionnés après agro-infection avec la souche 2659. Dix chevelus racinaires de clone 17 ont été sélectionnés après agro-infection avec la souche 15834. Les souches 2659 et 15834 ont été fournies par Marc Buée (INRA Nancy). Les graines et les vitroplants de chicorée ont été fournis par la société Florimond-Desprez.

### B) Méthodes de culture des chevelus racinaires

#### 1) Culture des chevelus racinaires sur milieu solide

Les chevelus racinaires sont conservés en boîtes de Petri sur milieu MSHR/2 [macro et micro-éléments de Murashige et Skoog x 0,5 (1962), Fer-Edta de Murashige et Skoog x 0,5 (1962), vitamines de Murashige et Skoog x 0,5 (1962), saccharose (30g/L), agar (6 g/L), pH 5,6], dans une salle de culture ayant une photopériode : 16h de jour / 8h de nuit ; thermopériode : 24±1°C le jour / 20±1°C la nuit. Les chevelus racinaires sont repiqués en fonction du temps mis à envahir la totalité de la boîte de Pétri.

#### 2) Culture des chevelus racinaires en milieu liquide

Pour la plupart des expériences, 400mg de chevelus racinaires issus d'une culture en milieu liquide et séchés sur papier stérile ont été mis en culture en milieu liquide MSHR/2 [macro et micro-éléments de Murashige et Skoog (1962), Fer-Edta de Murashige et Skoog (1962), vitamines de Murashige et Skoog (1962), saccharose (30g/L), pH 5,6], en Erlenmeyers de 50 ml contenant 20 ml de milieu, placés en agitation orbitale durant 21 jours, dans une salle de culture ayant une photopériode : 16h de jour / 8h de nuit ; thermopériode : 24±1°C le jour / 20±1°C la nuit.

#### 3) Elicitation par le méthyljasmonate

Sur des cultures âgées de 21 jours et cultivées en milieu liquide, une élicitation avec 15 µL de méthyljasmonate (MeJa) à une concentration de 0,1 M a été réalisée dans le but d'obtenir une concentration de 0,1mM dans le milieu. Les dilutions pour obtenir la solution de MeJa à 0,1 M ont été réalisées dans de l'éthanol pur. Différents témoins ont été mis en

place, à savoir un témoin avant élicitation c'est à dire sans éliciteur, et un témoin avec ajout de 15  $\mu\text{L}$  d'éthanol pur. Toutes les conditions de culture ont été menées en triplicata.

#### 4) Elicitation par l'ergostérol

Sur des cultures âgées de 21 jours et cultivées en milieu liquide une élicitation avec 15  $\mu\text{L}$  d'ergostérol à une concentration de 0,01 M a été réalisée dans le but d'obtenir une concentration de 0,01mM dans le milieu. Les dilutions pour obtenir la solution d'ergostérol à 0,01 M ont été réalisées dans de l'éthanol pur. Différents témoins ont été mis en place, à savoir un témoin avant élicitation c'est à dire sans éliciteur, et un témoin avec ajout de 15  $\mu\text{L}$  éthanol pur. Toutes les conditions de culture ont été menées en triplicata.

#### 5) Culture en milieu additionné de spermidine

Des cultures âgées de 9 jours ont été additionnées de spermidine trihydrochloride (SIGMA Aldrich) afin d'obtenir des concentrations en spermidine de l'ordre de  $10^{-2}\text{M}$ ,  $10^{-3}\text{M}$ ,  $10^{-4}\text{M}$  et  $10^{-5}\text{M}$  dans les milieux. Les cultures ont été arrêtées au bout de 21 jours, un témoin sans spermidine a été réalisé. Toutes les conditions de culture ont été menées en triplicata.

### C) Caractérisation moléculaire des chevelus racinaires

#### 1) Extraction des ADN

Les extractions d'ADN sont réalisées sur les chevelus racinaires cultivés en milieu solide. Les prélèvements de racines sont réalisés sous hotte stérile à flux laminaire dans le but de ne pas contaminer le milieu. Les racines sont broyées au mortier dans de l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La poudre est ensuite transférée dans un Eppendorf 1,5 ml jusqu'à la graduation 0,5 ml. Cette étape doit être réalisée à froid jusqu'à l'ajout du premier tampon du kit d'extraction dans le but d'éviter tous phénomènes d'oxydation. L'extraction est ensuite réalisée grâce à un kit NucleoSpin® Plant II, DNA, RNA, and protein purification (Macherey-Nagel). A la fin de cette étape, les ADN se trouvent dans une solution de 30  $\mu\text{L}$ . La quantité et la qualité (A260/A280 et A260/A230) des ADN sont ensuite vérifiées avec un spectrophotomètre Eppendorf Bio Photometer.

#### 2) Analyses PCR

Deux plasmides ont été utilisés pour la transformation génétique, le plasmide Ri ainsi qu'un plasmide binaire dans lequel a été inséré le gène *sht1* et qui possède un gène de résistance à la spectinomycine et un gène de résistance à la phosphinotricine. Il possède aussi les séquences LB et RB entre lesquelles se trouve le gène *sht1* en aval du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Afin de vérifier si la transformation a fonctionné quatre PCR différentes ont été réalisées :

- Une PCR avec amorces hybridant dans le gène *virD2* dans le but de vérifier que les chevelus racinaires ne sont plus infectés par *Agrobacterium rhizogenes*.

-Une PCR avec amorces hybridant dans le gène *rolB* dans le but de vérifier que le matériel biologique étudié est bien transformé par *Agrobacterium rhizogenes* et donc que nous travaillons bien sur des chevelus racinaires.

-Une PCR avec amorces hybridant dans le gène *sht* présent naturellement dans la plante

-Une PCR avec amorces hybridant dans le promoteur 35S et le gène *sht1* dans le but de déceler quels chevelus racinaires ont intégré le gène *sht1* inséré dans le vecteur binaire d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Les PCR sont réalisées dans un volume final de 15  $\mu\text{L}$  contenant 1,5  $\mu\text{L}$  de tampon Taq (x10) (Roche), 1,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM) (Roche), 0,6  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5 mM) (Applied biosystems), 1  $\mu\text{L}$  de chaque amorce (1,25  $\mu\text{M}$ ), 0,075  $\mu\text{L}$  de Taq Applied (5 U.  $\mu\text{L}^{-1}$ ), 2  $\mu\text{L}$  d'ADN matrice dilué au 1/5ème et 7,625  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  ultra pure (EUP). Après dénaturation à 94°C pendant 4 min, 35 cycles d'amplification sont enchainés. Un cycle est constitué de 30 sec de dénaturation à 94°C durant 4 min, suivi d'1 min d'hybridation à 58°C et pour finir 1 min d'élongation à 72°C. A la fin des 35 cycles une étape d'extension finale de 10 min à 72°C est réalisée puis les échantillons sont stockés à 4°C jusqu'à leur récupération.

Les produits PCR sont ensuite mélangés avec 5  $\mu\text{L}$  de tampon de charge puis déposés sur gel d'agarose 1%. Le marqueur de taille utilisé est le 1Kb plus DNA ladder (ThermoFisher Scientific). L'électrophorèse a lieu dans un tampon TAE x 0,5.

## D) Analyse de l'expression des gènes

### 1) Extraction des ARN, contrôle de leur qualité, quantité, et synthèse des ADNc

Les ARN totaux ont été extraits à partir de chevelus racinaires cultivés 21 jours en milieu liquide. Les extractions ont été réalisées au Tri-Reagent® (Molecular Research Center, Inc), en suivant le protocole du fournisseur. Les ARN extraits sont recueillis dans un volume final de 30  $\mu\text{L}$ . Après extraction les ARN sont stockés à -80°C. Dans le but d'obtenir la qualité et la quantité des ARN extraits, une analyse par électrophorèse sur puce (Expérior, Bio-Rad) est réalisée.

Par la suite les ARN sont traités à la DNase en utilisant le Turbo DNA-free Kit (Applied Biosystem). Puis la synthèse des ADNc à lieu en utilisant le Kit Reverse transcriptase Superscript III RNase H (Invitrogen). Les ADNc obtenus sont ensuite stockés à -20°C. Une PCR avec des amorces spécifiques d'un gène de référence (*tip41*) chez la chicorée est ensuite réalisée dans le but de vérifier si la rétro-transcription s'est bien déroulée.

### 2) Conditions de la qPCR

Les réactions de polymérisation en chaine sont réalisées en microplaques (96 puits) dans un volume réactionnel de 20  $\mu\text{L}$  comprenant 10  $\mu\text{L}$  de iQ SYBER Green Supermix (Bio-Rad), 5  $\mu\text{L}$  d'ADNc et 1,5  $\mu\text{L}$  de chaque amorce à une concentration de 5  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{L}$  d'EUP. Le protocole d'amplification est le suivant : 3 minutes à 95°C puis 40 cycles de 10 secondes à 95°C suivi de 30 secondes à 60°C.

Toutes les réactions sont réalisées sur 3 répétitions biologiques en duplicata technique. Et pour chaque paire d'amorces une courbe de fusion est réalisée dans le but de vérifier la spécificité de l'amplification et l'absence de dimères d'amorces.

### 3) Sélection des gènes de référence

Un gène de référence est un gène exprimé de façon stable dans les conditions de l'étude, utilisé pour la quantification relative de l'expression de gènes par qPCR. Des gènes de référence ont été validés au sein du laboratoire (Delporte et al. 2015) pour des cultures cellulaires et des plantes de *Cichorium intybus*. Les huit meilleurs gènes de référence ont été sélectionnés parmi les douze étudiés (cf annexe II). Les amorces utilisées sont celles définies par Delporte et al (2015).

Le but de cette analyse est de sélectionner les gènes de référence les plus stables pour nos chevelus racinaires. Pour cela 3 logiciels les plus fréquemment employés ont été utilisés. A savoir : geNorm (Vandesompele et al. 2002), NormFinder (Andersen et al. 2004), et BestKeeper (Pfaffl et al. 2004).

### 4) Analyse de l'expression des gènes d'intérêt

Afin d'analyser le taux d'expression des gènes sélectionnés pour l'étude, la méthode par quantification relative a été utilisée. Pour cela la formule suivante a été utilisée.

$$Q = \frac{E^{(\Delta CT \text{ gene cible})}}{F^{(\Delta CT \text{ gène de reference})}}$$

Avec Q la quantification relative, E l'efficacité de la PCR du gène d'intérêt et F l'efficacité de la PCR du gène de référence,  $\Delta CT = CT_{\text{condition témoin}} - CT_{\text{condition étudiée}}$  (Pfaffl 2001)

### 5) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Des tests d'analyse de la variance (ANOVA) ont été effectués.

### 6) Conditions RT-PCR

Dans le but de mettre en évidence l'expression du gène SHT deux PCR sont réalisées avec deux jeux d'amorces hybridant dans le gène SHT. La seconde PCR étant réalisée pour valider la première.

-Le jeu d'amorces DG111 «GTGAGATGAGCCGTGGATTT» DG127  
« TCAACATTCCATATCAATATCTTGGT »

qui donne un fragment de 605 pb.

-Le jeu d'amorces DG241 « CAAGGCTAAACCCTCCACAA DG242 «CCTGAGGACTGGGTCACTGT »  
qui donne un fragment de 310 pb.

Le protocole et le programme des PCR sont les mêmes que ceux réalisés en C)2) page 9.

## E) Caractérisation biochimique des chevelus racinaires

### 1) Récolte et traitement des échantillons de chevelus racinaires

Le milieu liquide de culture des chevelus racinaires est récupéré en tubes Falcon de 15ml. Les chevelus racinaires sont ensuite rincés avec de l'EUP sur un système de filtration utilisant une pompe à vide puis ils sont pesés avant d'être congelés dans de l'azote liquide. Tous les échantillons sont ensuite lyophilisés pendant une durée de 48 heures. Après cette étape environ 20 mg de chevelus racinaires sont broyés (1 min à 30 Hz) grâce à un broyeur à bille (Retsch) afin de préparer l'extraction des polyphénols. Un mL de solution d'extraction méthanol/eau/acide acétique (75/23/2) est ajouté dans chaque tube de broyat. Les échantillons sont incubés une nuit à 4°C sous agitation (40 Rpm). Après centrifugation (15min, 14000g, 4°C) le surnageant est récupéré, et 1 mL de solution d'extraction est ajouté au culot. Après 15 sec de vortex les échantillons sont une nouvelle fois centrifugés (15min, 14000g, 4°C) et le surnageant est récupéré puis poolé avec le premier.

### 2) Elimination des sucres présents dans les milieux de cultures

Pour analyser les milieux de culture en HPLC il est nécessaire d'éliminer les sucres des milieux car ceux-ci pourraient interagir avec la résine de la colonne et provoquer des phénomènes de colmatage qui seraient néfastes à l'analyseur. Pour cela les milieux de culture ont été passés sur colonne Superclean<sup>TM</sup> ENVI<sup>TM</sup>-18 SPE 100 mg. L'équilibrage de la colonne est réalisé avec 3 ml de méthanol suivi par 3ml d'acide acétique à 0,1 mM. Les milieux de culture avant d'être déposés sur la colonne sont acidifiés avec 10% (v/v) d'acide chlorhydrique à 1,2M. Au maximum 10 ml de milieu est déposé sur la colonne. Le nettoyage est réalisé avec 3ml d'acide acétique pH 2,75 puis vient l'élution avec 2ml de méthanol. Les échantillons récupérés sont ensuite concentrés environ quatre fois à l'Eppendorf concentrator 5301.

### 3) Analyse HPLC

Cent  $\mu\text{L}$  d'extrait sont filtrés par centrifugation (3000g, 3min) grâce à une plaque de filtres (Acroprep<sup>TM</sup>, 0,45  $\mu\text{m}$ ) et déposés sur une plaque HPLC. L'appareil HPLC utilisé est un LC-20A de Shimadzu System équipé d'un détecteur UV à barrette de diode (SPD-20A). La détection des polyphénols s'opère à une longueur d'onde de 320nm. La séparation des polyphénols se fait en phase inverse avec une colonne kinetex PFP de dimension 100x4,4 mm (Phenomenex) avec une méthode (cf annexe I) qui a été optimisée pour la séparation des acides hydroxycinnamiques. L'élution s'effectue en utilisant un mélange binaire de solvants : A : EUP, B : acétonitrile. Les deux solvants sont acidifiés avec l'ajout de 0,1% d'acide phosphorique (v/v). La température du four est de 45°C et le débit de travail de 1,1 ml.min<sup>-1</sup>. La quantification est réalisée par étalonnage externe grâce à des standards. Le volume injecté dans la colonne est de 2  $\mu\text{L}$  pour les standards de 3-CQA et de 3-5 diCQA. Le volume d'injection est de 2  $\mu\text{L}$  pour la quantification en CQA et diCQA. En revanche, pour la détection de tricoumaroylspermidine, ce volume est de 10  $\mu\text{L}$ .



### III) Résultats et discussions

#### A) Analyse de chevelus racinaires transformés avec *sht1*

##### 1) Caractéristiques morphologiques des chevelus racinaires

Toutes les souches de chevelus racinaires ont été cultivées sur milieu solide pour assurer leur maintenance et une caractérisation morphologique a pu être entreprise après environ un mois de culture. La caractérisation a porté sur l'aspect des racines, la capacité à occuper la surface de la boîte de Petri, la durée maximale de culture avant repiquage, la présence de poils absorbants, la présence de cals et de bourgeons. Les résultats sont reportés dans le tableau 1. (Illustrations des chevelus racinaires annexe II).

	Aspect des racines	Occupation de l'espace	Durée maximale de culture	Poils absorbants	% des souches formant des cals	% des souches formant des bourgeons
Orchies + 2659	Fines blanches Racines latérales nombreuses	Totale et homogène	4 semaines	+++	8/20 soit 40%	1/20 soit 5%
Orchies + 15834	Grosses vertes Peu de racines latérales	Tendance à se diriger vers la périphérie Peu de racines aériennes	6 semaines	+	5/10 soit 50%	6/10 soit 60%
Clone17 + 2659	Fines vertes Racines latérales nombreuses	Totale et homogène	4 semaines	+++	14/20 soit 70%	7/20 soit 35%
Clone17 + 15834	Grosses vertes et marron Peu de racines latérales	Tendance à se diriger vers la périphérie Peu de racines aériennes	6 semaines	+	8/10 soit 80%	10/10 soit 100%

Tableau 1 : Caractérisation morphologique des chevelus racinaires.

Il ressort de ces résultats que les chevelus racinaires présentent des caractéristiques différentes en fonction de la souche d'agrobactérie utilisée. Par exemple la souche 15834 favorise l'apparition de bourgeons, donne des chevelus racinaires beaucoup moins ramifiés et ralentit la croissance. Cela peut sans doute s'expliquer par le fait que les plasmides Ri des souches 2659 et 15834 sont différents. Le génotype de la plante entre aussi en compte, le clone 17 par exemple, donne beaucoup plus de cals que la variété Orchies

En effet le plasmide Ri de la souche 15834 possède deux régions sur son T-DNA (TL et TR), la partie TL possède les quatre oncogènes, TR, elle, ne possède que l'oncogène *rolB* (Veena and Taylor. 2007), de ce fait les chevelus racinaires transformés avec la souche 15834 doivent exprimer *rolB* deux fois plus que celles transformés avec 2659. D'après Bulgakov (2008) une forte présence de transcrits *rolB* diminue la croissance cellulaire ce qui explique

pourquoi les souches de chevelus racinaires transformés avec la souche bactérienne 15834 ont une croissance inférieure aux souches de chevelus racinaires transformés avec la souche 2659. De plus d'après Altamura (2004), ce gène serait aussi responsable de la production de méristèmes ce qui expliquerait le fort taux de mise en place de bourgeons chez les souches de chevelus racinaires transformés avec l'agrobactérie 15834.

## 2) Caractérisation moléculaire des chevelus racinaires

Une analyse moléculaire a été entreprise dans le but de savoir si le matériel végétal étudié a bien intégré le gène *rolB* et donc si les souches obtenues sont bien des chevelus racinaires. Si *Agrobacterium rhizogenes* a été éliminé cela se traduira par une absence d'amplification du gène *virD2*. Si la bactérie est toujours présente le chevelu racinaire sera mis en culture sur milieu MSHR/2 plus ampicilline dans le but de l'éliminer. Enfin dans le but de savoir si le gène *sht1* a bien été inséré dans le génome du chevelu racinaire une partie du promoteur 35S plus *sht1* a été amplifié. Pour témoin, nous avons réalisé une amplification avec des amorces spécifiques du gène *sht1* (sauvage) déjà présent dans le génome, les résultats sont reportés dans le tableau 1. Pour Orchies + 2659, 14 transformations sur 20 ont intégré le gène *sht1*. Pour Orchies + 15834, 7 transformations sur 10, pour Clone 17 + 2659, 12 transformations sur 20 et pour Clones 17 + 15834, 7 transformations sur 10. (Tableau 2)

Nom	Chevelu racinaire n°	<i>virD2</i>	<i>rolB</i>	<i>sht1</i>
Orchies + 2659	1		X	X
	2		X	X
	5		X	X
	7		X	X
	10	X	X	X
	12		X	X
	14		X	X
	15		X	
	17		X	
	18		X	X
	19		X	X
	21		X	X
	23		X	
	24		X	X
	25		X	X
	28		X	
	31		X	
	33		X	X
	35		X	X
	36		X	
Orchies + 15834	5		X	
	9		X	X
	12		X	
	15	X	X	X
	18		X	X
	20		X	X
	26		X	
	27		X	X
	30		X	X
	33		X	X

Nom	Chevelu racinaire n°	<i>virD2</i>	<i>rolB</i>	<i>sht1</i>
Clone 17 + 2659	1		X	
	2		X	X
	3		X	
	7		X	
	10		X	
	12		X	X
	13		X	X
	15		X	X
	16		X	
	21		X	X
	22		X	X
	26		X	X
	27		X	X
	28		X	X
	29		X	
	30		X	X
	31	X	X	
	32		X	
	33		X	X
	35		X	X
Clone 17 + 15834	6		X	X
	11		X	X
	13		X	X
	14		X	X
	16		X	X
	18		X	X
	19		X	X
	21		X	
	22		X	
	33		X	

Tableau 2 : Récapitulatif de la caractérisation moléculaire des chevelus racinaires, une croix signifie la présence d'une bande sur gel d'agarose après PCR ; en vert les souches ayant intégré le gène de la *sht1*, en orange les souches encore contaminées.

Au final 67% des chevelus racinaires ont intégré le gène de la *sht1*. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu lors de la surexpression d'une tryptophane décarboxylase (*tdc*) dans des chevelus racinaires de *Rauwolfia serpentina* (Mehrotra et al 2013). En effet lors de cette étude

60% des chevelus racinaires avaient intégré le gène *tdc*. Ce résultat montre donc que la technique d'insertion du gène *sht1* sous promoteur fort a bien fonctionné chez la chicorée.

### 3) Caractérisation biochimique des cultures chevelus racinaires

Une caractérisation des composés phénoliques plus particulièrement des acides hydroxycinnamiques a aussi été entreprise sur des chevelus racinaires cultivés en milieu liquide et âgés de 21 jours.

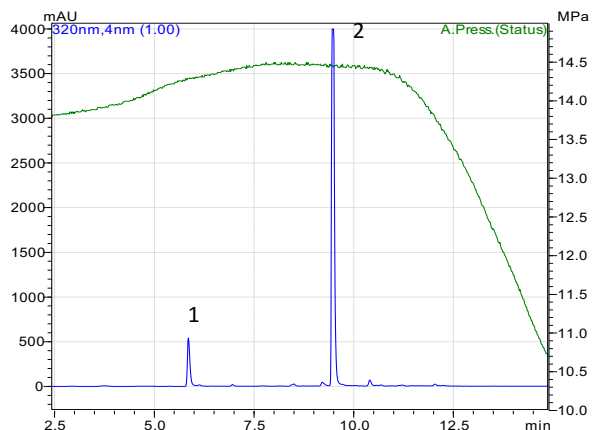


Figure 3 : Chromatogramme caractéristique d'une extraction méthanolique de chevelus racinaires. En (1) le pic correspondant au 3-CQA, en (2) le pic correspondant au 3,5-di-CQA.

Sur un chromatogramme (cf figure 3) on décèle l'apparition de deux pics majeurs, l'acide chlorogénique (3 CQA) et l'acide isochlorogénique (3,5 di-CQA) ainsi que d'autres composés moins visibles et non déterminés. Une quantification de ces deux acides hydroxycinnamiques a été réalisée sur toutes les souches.

On peut constater que les couples Orchies+2659 et Clone17+15834 sont les plus productifs, certains chevelus racinaires du couple Orchies+2659 ont des productions en 3,5-di-CQA supérieures à 15% de MS ce qui correspond à environ 300 µmol/gMS. Avec un ratio di-CQA/CQA proche de 3 voire 5. En revanche les couples Orchies+15834 et Clone17+2659 ont des productions en di-CQA plus faibles avec un ratio di-CQA/CQA proche de 2 voire 1 pour le couple Orchies+2659 (cf figure 4).

Au laboratoire le CQA et le di-CQA ont aussi été dosés dans des racines de plantules âgées de 4 semaines. Les concentrations de CQA sont de l'ordre de 0,5% de MS et celles de di-CQA de l'ordre de 1,4% de MS (communication personnelle de la doctorante Delporte). Nous pouvons donc constater que le fait de produire des chevelus racinaires quadruple la

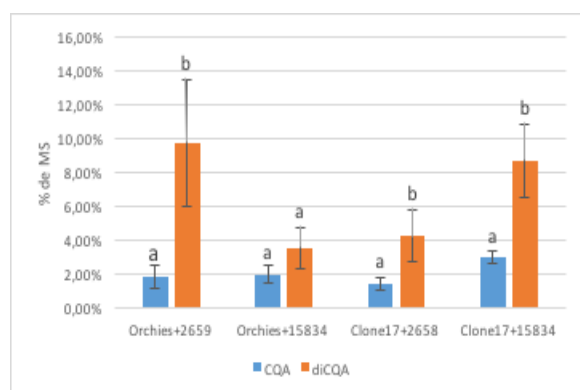


Figure 4 : Quantité moyenne de 3 CQA et de 3,5 di CQA en % de masse sèche chez les quatre couples "chicorée+agrobactérie". Une ANOVA a été réalisée avec une P value de 5% pour chaque molécule.

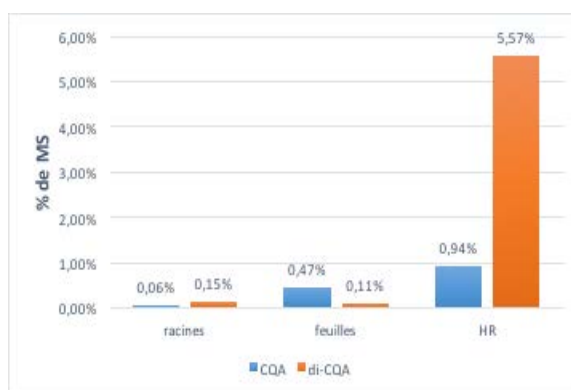


Figure 5 : Quantité de 3 CQA et 3,5 di CQA dans des racines, des feuilles et des chevelus racinaires (HR) (Malarz et al 2014)

production en CQA et peut quintupler celle de di-CQA comme pour les couples Orchies + 2659 et clone 17 + 15834.

En ce qui concerne l'influence du facteur souche bactérienne sur la production en 3 CQA et 3,5 diCQA, une analyse statistique ANOVA 2 facteurs, avec répétitions d'expériences nous a permis de conclure qu'il y a bien une interaction entre les génotypes de chicorée et les souches bactériennes sur la production en 3 CQA et 3,5 diCQA mais qu'il y a pas d'effets particuliers en fonction de la souche bactérienne sur la production en CQA et en di-CQA.

Dans l'article de Malarz (2013) le CQA et le di-CQA ont été dosés dans des chevelus racinaires de *Cichorium intybus* produits avec la souche 1855 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Comme pour nos chevelus racinaires nous pouvons constater que les leurs produisent beaucoup plus de CQA et de di-CQA que les racines et les feuilles. En revanche ceux de notre laboratoire produisent environs 1,5 fois plus de CQA et à peu près autant de diCQA pour les couples Orchies+15834 et Clone17+2659. Par contre certains chevelus racinaires du couple Orchies+2659 produisent presque 3 fois plus de di-CQA. Ces chevelus racinaires seront donc de bon candidats pour l'étude de l'iso-chlorogénate synthase.

La présence de phénolamides a aussi été recherchée. Cette recherche a été réalisée chez trois chevelus racinaires ayant intégré le gène *sht1* (SHT+) et chez trois chevelus racinaires n'ayant pas intégré le gène (SHT-) pour chaque couple « chicorée+agrobactérie ». Les chevelus racinaires ont été choisis aléatoirement et sont reportés dans le tableau 3.

Couples	SHT+			SHT-		
	N° de la souche			N° de la souche		
Orchies+2659	2	18	35	23	28	36
Orchies+15834	9	18	27	5	12	26
Clone17+2659	2	21	28	1	3	29
Clone17+15834	6	11	18	21	22	33

Tableau 3 : Récapitulatif des souches sélectionnées pour la recherche de production de tricoumaroylspermidine.

Les phénolamides comme la tricoumaroylspermidine ont un spectre qui possède un maximum d'absorbance à 285nm, ce maximum d'absorbance est suivi par un petit épaulement qui leur est caractéristique (cf figure 6).

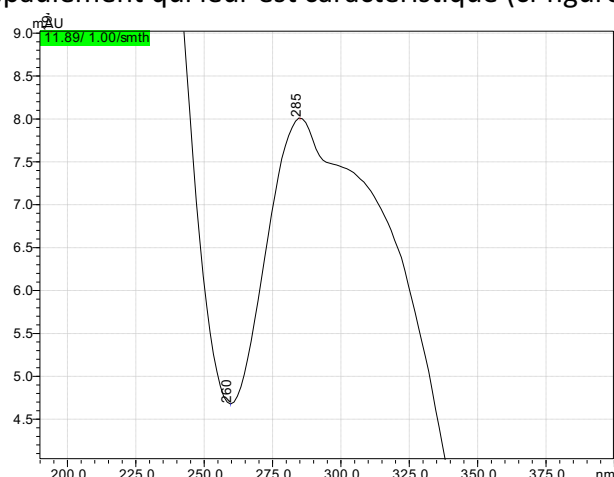


Figure 6 : Spectre caractéristique des polyamides.

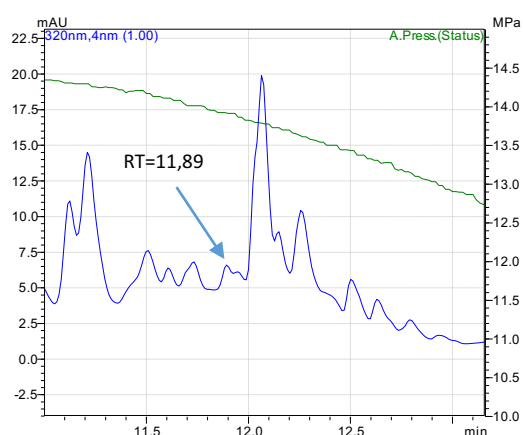


Figure 7 : Exemple de chromatogramme ou l'on décèle un micro pic avec un temps de rétention de 11,89 min ayant un spectre similaire à celui de la figure 4.

De tels spectres ont été retrouvés sur des micros-pics ayant un temps de rétention de 11,89 minutes (cf figure 7) chez cinq souches ayant intégré le gène *sht1* et trois n'ayant pas

intégré le gène. Ces résultats sont peu concluants, étant donné la taille des pics analysés. Il pourrait s'agir de la synthèse établie par l'expression du gène de la *sht* sauvage déjà présente dans le génome de la plante. La très forte production en 3-CQA et en 3,5 di-CQA entraîne peut-être un effet de compétition pour le coumaroyl-CoA ce qui empêcherait la synthèse de tricoumaroylspermidine. L'absence d'un pic de tricoumaroylspermidine peut aussi être due à une absence de spermidine, ou alors à un mécanisme de « gène silencing » mis en place par les chevelus racinaires.

#### 4) Analyses transcriptomiques des chevelus racinaires

Les analyses biochimiques n'ayant pas révélé une forte production de tricoumaroylspermidine par les chevelus racinaires ayant intégré le gène *sht1* nous avons donc décidé de vérifier si le gène était bien exprimé. Un résultat positif montrerait que les chevelus racinaires n'ont pas mis en place de « gene silencing » qui détruirait les ARNm transcrits. Pour cela nous avons réalisé les extractions d'ARN chez les souches sélectionnées précédemment (cf tableau 3 page 15).

Une rétrotranscription suivie de deux PCR avec deux couples d'amorces hybridant dans le gène SHT ont été réalisées. Grâce aux résultats obtenus après migration sur gel d'agarose 1%, un classement du niveau d'expression a été mis en place. Ce classement se base sur l'intensité des spots obtenus lorsqu'il y a amplification. Il ressort que toutes les souches qui présentent une intensité forte sont des souches SHT+. Ces résultats montrent que la technique de surepression d'un gène fonctionne chez la chicorée. Les couples Orchies+2659 (2) et Clone17+15834 (6), qui présentent les plus fortes intensités ont été sélectionnées pour les expériences d'élicitation.

Classement	couple	N° de la souche
1ER	Orchies+2659	2
	Clone 17+15834	6
2EME	Orchies+15834	27
	Clone17+2659	28
3EME	Orchies+15834	9
	Orchies+2659	18
	Clone17+2659	2

Tableau 4 : Classement du taux d'expression du gène *sht1* chez les souches sélectionnées pour l'étude biochimique sur les phénolamides.

#### 5) Elicitations au Méthyljasmonate et ergostérol

Pour les élicitations au méthyljasmonate et à l'ergostérol, les souches de chevelus racinaires qui ont montré l'expression du gènes *sht1* la plus élevée, c'est à dire Orchies+2659 2 et Clone 17+15834 6 ont été choisies. Après 48h et 96h d'élicitation avec une concentration d'environ 0,1mM, une analyse biochimique a été réalisée. Les résultats sont reportés dans les figures 8 et 9 page 17.

L'analyse biochimique des chevelus racinaires élicités au méthyljasmonate n'a pas permis de déceler de variation de production de tricoumaroylspermidine. En revanche, on peut noter l'apparition d'un 3<sup>ème</sup> pic (cf figure 9), il se pourrait que celui-ci soit du tri-caféoyl-CoA (tri-CQA) car son spectre est caractéristique des acides hydroxycinnamiques mais un passage à la spectrométrie de masse est nécessaire pour valider cette hypothèse. L'élicitation au méthyljasmonate a pour but de stimuler la production des métabolites secondaires (Malarz 2007) ce qui aurait pu permettre une modification des flux de molécules au sein de la voie de

biosynthèse des acides hydroxycinnamiques. Cette modification de flux aurait pu permettre de rendre plus accessible la coumaroyl CoA et la spermidine à la SHT1 dans le but de produire la tricoumaroylspermidine.

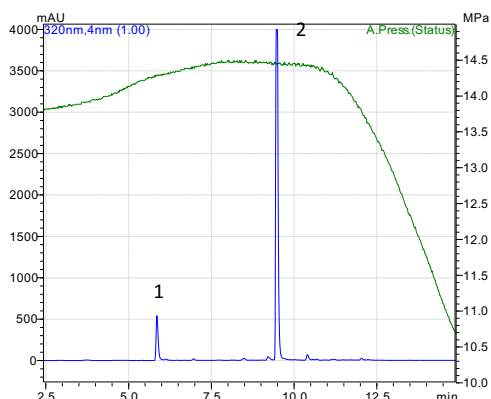


Figure 8 : Chromatogramme obtenu après analyse HPLC de la souche Orchies+2659 2 élicitée avec de l'éthanol (témoin) durant 96 heures. (1)=3 CQA (2)=3,5 diCQA.

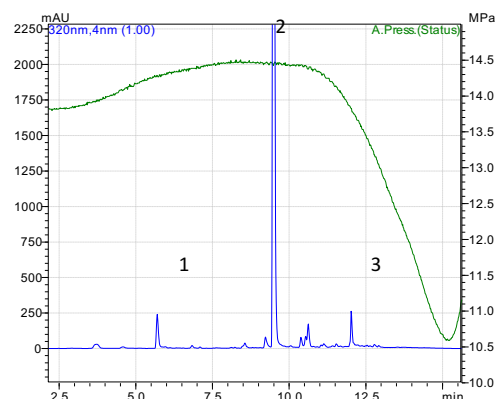


Figure 9 : Chromatogramme obtenu après analyse HPLC de la souche Orchies+2659 2 élicitée avec du méthyljasmonate durant 96 heures. (1)=3 CQA ; (2)=3,5 diCQA ; (3) représente le pic soupçonné être celui du tri-caféoy-CoA.

En ce qui concerne l'élicitation à l'ergostérol, l'analyse biochimique des chevelus racinaires n'a pas permis une production de tétracoumaroylspermidine accrue

Pourtant une élicitation fongique augmente la production de spermidine dans les chevelus racinaires de *Cichorium intybus* (Bais et al 2000) elle accroît aussi la production de spermidine dans le tabac (Dadakova 2013). En posant l'hypothèse que la spermidine était le substrat déficient pour la synthèse de tricoumaroylspermidine, l'élicitation à l'ergostérol aurait pu permettre d'augmenter la production de spermidine dans les chevelus racinaires, une production de tricoumaroylspermidine aurait pu être espérée.

## 6) Cultures avec spermidine

La culture en milieu MSHR/2 additionné de spermidine a permis de mettre en évidence que les chevelus racinaires continuaient à se développer à des concentrations supérieures ou égales à  $10^{-3}$  M, à  $10^{-2}$  M leur croissance est stoppée.

L'analyse biochimique des chevelus racinaires ayant été cultivés en milieu additionné de spermidine n'a pas non plus permis d'obtenir la production de tricoumaroylspermidine.

## 7) Analyse des milieux de culture

L'analyse des milieux de culture a été réalisée car l'hypothèse que l'enzyme SHT1 pouvait être pariétale a été émise au sein du laboratoire. En effet après avoir taggué le gène de la *sht1* avec la Green Fluorescent Protein (GFP) des cellules de feuilles de tabac ont été transformées. Après analyse au microscope à fluorescence ces cellules ont fluorescé. En revanche après avoir été transformées en protoplastes ces cellules ne fluorescent plus. Ce phénomène a donc permis de poser cette hypothèse. De ce fait la présence de tricoumaroylspermidine au sein des milieux de culture chez les chevelus racinaires ayant intégré le gène *sht1* pourrait la valider. Les milieux de culture ont donc été analysés en parallèle de chaque expérience. Pour les élicitations, aucun milieu n'a révélé la production de tricoumaroylspermidine, en revanche l'analyse des milieux de culture pour la souche

clone17+15834 (6) (souche qui présentait la meilleure amplification du gène *sht1*), ayant été cultivée à  $10^{-2}$  M de spermidine a permis de déceler un pic possédant un spectre caractéristique des phénolamides à un temps de rétention de 12,17. Les analyses de la souche témoin clone17+2659 (10) n'ayant pas intégré le gène *sht1*, cultivée dans les mêmes conditions, elles, n'ont pas décelé de pic caractéristique. Une fois ce pic caractérisé grâce à de la spectrométrie de masse, si celui-ci correspond bien à de la tricoumaroylspermidine alors l'hypothèse et la fonction putative du gène pourrait être validée.

## B) Expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides hydroxycinnamiques

Dans cette étude nous nous sommes demandés quelle influence pouvait avoir la transformation par *Agrobacterium rhizogenes* sur la production des acides hydroxycinnamiques. Pour cela nous avons quantifié l'expression de différents gènes intervenant dans les voies de biosynthèses des acides hydroxycinnamiques dans les chevelus racinaires, à savoir les gènes codant pour les enzymes de la PAL, la 4CL, les 2 HCTs et les 3 HQTs présentes chez la chicorée ainsi que les deux lipases candidates (*lip1* et *lip2*) pour la synthèse de di-CQA. De plus des gènes capables d'activer cette voie ont aussi été testés, comme le gène *aoc* codant pour une enzyme (allène oxyde cyclase) intervenant dans la synthèse du jasmonate (Fang et al. 2015) et le gène *myc2* codant pour le facteur de transcription Myc2 (Zhou et al. 2016).

La quantification de l'expression d'un gène au sein d'un organisme peut se faire de deux techniques différentes utilisant toutefois un outil commun, la PCR quantitative en temps réel qui s'appuie sur des mesures faites pendant la phase dite exponentielle de la PCR. La technique de la quantification absolue utilise un standard externe de concentration en particules connu sur lequel on réalise des dilutions dans le but de déterminer la concentration absolue du gène cible. Cette technique est très utilisée pour la détermination de particules infectieuses (bactéries, virus). Pour déterminer le taux d'expression d'un gène, il est plus facile d'utiliser la quantification relative, ou la concentration du gène cible est exprimée par rapport à un gène de référence provenant du même échantillon biologique. C'est ce que nous avons fait.

### 1) Sélection des souches de chevelus racinaires et des gènes de référence

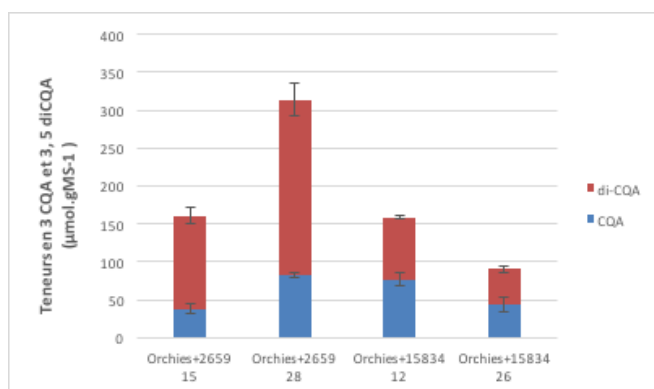


Figure 10 : Profil biochimique des souches de chevelus racinaires sélectionnées pour l'étude de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des acides hydroxycinnamiques. Une ANOVA a été réalisée avec une P value de 5% pour chaque molécule

Cette étude a été réalisée sur les souches de chevelus racinaire Orchies+2659 (15), Orchies+2658 (28), Orchies+15834 (12) et Orchies+15834 (26). Ces chevelus racinaires ont été choisis car ils n'ont pas intégré le gène *sht1*, ainsi que pour leurs profils biochimiques en CQA et en di-CQA. En effet les deux couples Orchies+2659 ont une concentration en di-CQA environ trois fois supérieure à celle en CQA alors que les couples Orchies+15834 ont des concentrations



en CQA et di-CQA similaires. Il sera donc intéressant de comparer les profils d'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse ainsi que de certains facteurs de transcription pour essayer de mieux comprendre l'impact de la transformation d'*Agrobacterium rhizogenes* sur la production des acides hydroxycinnamiques.

Des gènes de références ont déjà été testés sur des cultures cellulaires et des plantes de *Cichorium intybus* par Delporte et al (2015). Sur les 18 gènes testés au sein de la publication les huit meilleurs à savoir *tip41*, *ubc*, *clath*, *pip2a*, *prof*, *sand*, *act2* et *ubq10* (Annexe II) ont été testés sur ces quatre couples.

## 2) Evaluation de la stabilité d'expression des gènes de référence

Pour évaluer la stabilité d'expression des gènes de référence une q-PCR a été réalisée pour les 8 gènes sélectionnés. Chaque souche a été analysée en triplicata biologiques et duplicata techniques. Le taux d'expression d'un gène est déterminé grâce aux « Cycles Threshold » (CT), ils correspondent au nombre de cycles nécessaire pour que la fluorescence soit détectée par l'analyseur durant la phase exponentielle de la PCR. Plus le CT sera élevé, moins le gène sera exprimé.

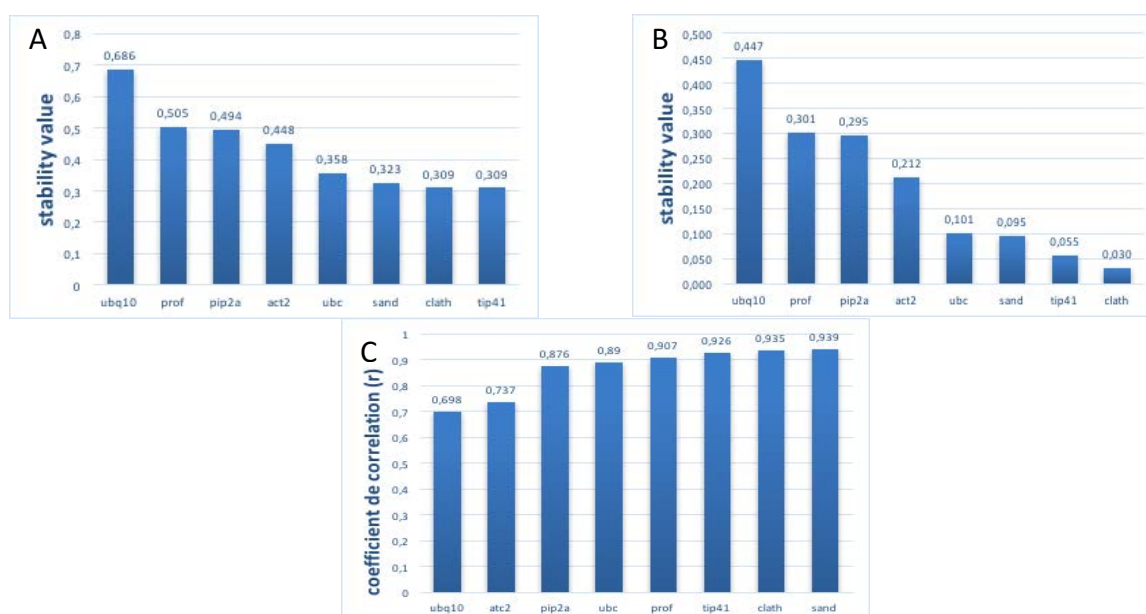


Figure 11 : Classement des gènes de référence selon geNorm (A), NormFinder (B) et BestKeeper (C) à partir des données de qPCR

Une fois les CT obtenus ils ont été analysés par trois logiciels ; à savoir, geNorm, NormFinder et BestKeeper, dans le but d'évaluer la stabilité de chaque gène. NormFinder et geNorm donnent tous deux une valeur d'expression pour chaque gène, plus cette valeur sera faible plus le gène est dit stable. La valeur seuil pour définir un gène comme étant stable est de 0,55. BestKeeper quant à lui établit un coefficient de corrélation (r) avec le BestKeeper Index, plus ce coefficient sera élevé plus le gène sera stable.

En fonction des résultats donnés par les trois logiciels un classement a été élaboré pour connaître quel est le meilleur gène de référence parmi les huit testés.



Nous avons choisi les deux meilleurs gènes de référence, à savoir *clath* et *tip41*. Pour la quantification relative des gènes d'intérêt, nous ferons la moyenne géométrique des CT de ces deux gènes de référence (Vandesompele et al. 2002).

gene	Classement			score	Classement final
	geNorm	Normfinder	BestKeeper		
<i>clath</i>	1	1	2	4	1
<i>tip41</i>	1	2	3	6	2
<i>sand</i>	2	3	1	6	2
<i>ubc</i>	3	4	5	12	3
<i>act2</i>	4	5	7	16	4
<i>pip2a</i>	5	6	6	17	5
<i>prof</i>	6	7	4	17	5
<i>ubq10</i>	7	8	8	23	6

Tableau 5 : Classement des gènes de référence.

Le gène *clath* est celui qui s'est avéré le plus stable dans les plantules de chicorée et le gène *tip41* le plus stable dans les cultures cellulaires (Delporte et al. 2015). Maroufi et al (2010) avait réalisé un classement de sept gènes de référence chez la variété « Hera » de chicorée et un gène codant pour une actine c'était avéré être le meilleur candidat. Des gènes de référence considérés comme stables dans de nombreuses circonstances, chez de nombreuses espèces, comme *ubq10* et *act2* ont eux aussi été testés et se sont montrés peu satisfaisants chez les chevelus racinaires.

Cela nous montre bien que les gènes de référence ne sont pas forcément les mêmes d'une espèce à l'autre voire d'une variété à l'autre. De plus la stabilité d'un gène de référence peut aussi dépendre des conditions environnementales, du stade physiologique des plantes lors de l'étude ainsi que de l'organe étudié (Maroufi et al. 2010). De ce fait il est nécessaire de vérifier la stabilité de différents gènes de référence et de sélectionner le meilleur en fonction des conditions de l'étude avant la quantification relative de gènes d'intérêt.

### 3) Quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt

La mise au point de la qPCR nous a permis de sélectionner et de valider des gènes de référence pour l'étude de gènes d'intérêt chez les chevelus racinaires. La quantification relative a donc pu être utilisée sur les onze gènes sélectionnés. Les résultats sont reportés dans la figure 12 page 21.

Nous pouvons constater (figure 12) que chez les souches transformées avec la souche 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes*, le gène *aoc* est significativement plus exprimé que chez les souches transformées avec la souche 2659 d'*Agrobacterium rhizogenes*, de même pour le facteur de transcription *myc2*. Ceci montre que la voie de biosynthèse du jasmonate est plus active chez ces chevelus racinaires là. Une forte production de jasmonate accroît la voie de signalisation initiée par celui-ci, ce qui se traduit par une forte expression du facteur de transcription Myc2. On peut donc supposer que les produits d'expression du gène *rolB* induisent la production de jasmonate ce qui stimule la voie de signalisation. En revanche nous pouvons voir que les souches dont la voie du jasmonate est la plus induite, sont les souches où la production de di-CQA est la plus faible (cf figure 10 page 18). Or une induction de la voie de signalisation du jasmonate est sensée stimuler la production de di-CQA (Rapport de stage SADV 2011, Adeline Harant), il est donc difficile de corréler l'induction de la voie de signalisation du jasmonate avec la production de di-CQA au sein des chevelus racinaires.

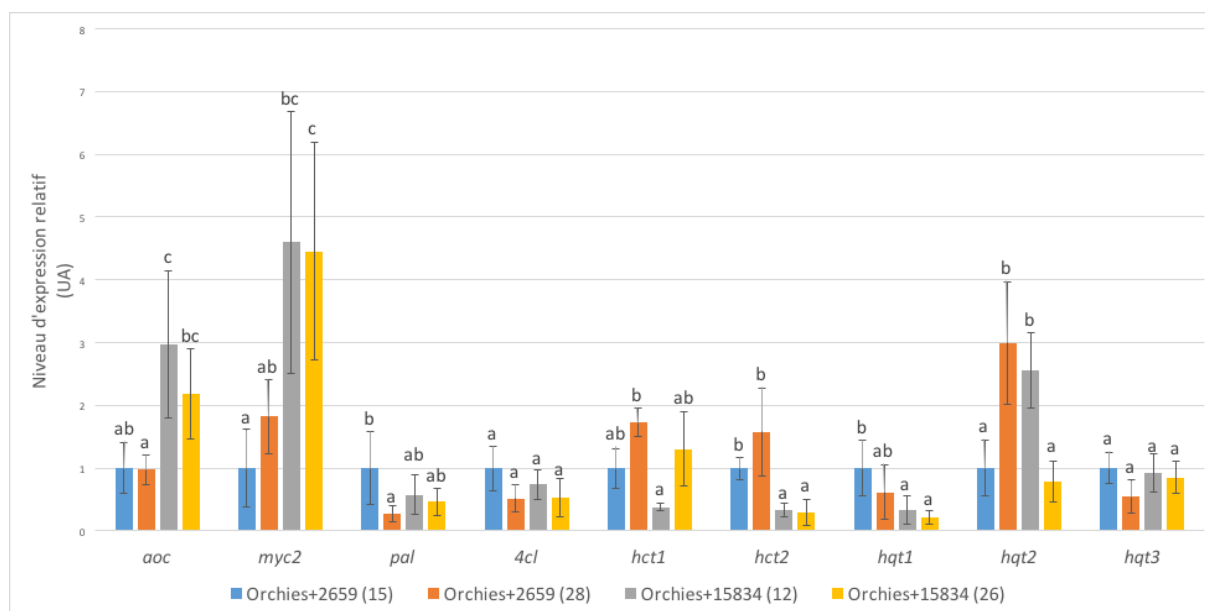


Figure 12 : Expression relative des gènes codant pour AOC, MYC2, PAL, 4CL, HQTs et HCTs dans les quatre souches de chevelus racinaires sélectionnées. Les expressions sont normalisées par rapport au niveau d'expression de la souche Orchies+2659 (15). Les barres d'erreurs matérialisent l'erreur standard de la moyenne. Les lettres représentent les résultats de l'ANOVA avec une différence significative établie pour une p-value <5%.

Concernant les deux lipases candidates pour la synthèse de di-CQA, les résultats ont montré soit des CT très élevés, de l'ordre de 35, soit une absence d'amplification. On peut donc dire que les lipases ne sont pas exprimées dans les chevelus racinaires, ce qui peut invalider l'hypothèse de leur action dans la synthèse du di-CQA. Il nous sera donc difficile de raisonner sur la production de di-CQA pendant cette étude. De ce fait, nous raisonnerons sur la production de CQA en supposant que la synthèse de di-CQA nécessite deux molécules de CQA. Ainsi nous traduirons le profil biochimique quantitatif des souches (figure 10 page 18), en données qualitatives en utilisant la concentration en CQA de la souche Orchies+2659 (15) égale à 1.

Souche	15	28	12	26
Eq CQA	7	14	6	3

Tableau 6 : Equivalent CQA (eq CQA) chez les différentes souches. Exemple : La souche 28 produit 2 fois plus de CQA que la souche 15 et à un ration di-CQA/CQA=3, en supposant qu'il faut 2 CQA pour produire 1 di-CQA et que [CQA] de la souche n°15=1 alors EqCQA(28)=1x2+3x2x2=14

De plus pour faciliter la lecture des profils d'expression des gènes *hcts* et *hqts* de la figure 12, et dans le but de pouvoir corréliser plus facilement ces données à la production en équivalent CQA dans les souches (Tableau 6), nous transformerons ces données en données qualitatives en attribuant la note de 3 pour une différence significative de « b », la note de 2 pour une différence significative de « ab » et la note de 1 pour une différence significative de « a »

souche	<i>hct1</i>	<i>hct2</i>	<i>hqt1</i>	<i>hqt2</i>	<i>hqt3</i>	total
15	2	3	3	1	1	10
28	3	3	2	3	1	12
12	1	1	1	3	1	7
26	2	1	1	1	1	6

Tableau 7 : Profils d'expressions transformés en données qualitatives.

D'après Legrand et al (2016) la synthèse du CQA chez la chicorée nécessite en premier lieu de produire du cafféoyl-Coa, celui-ci est produit grâce aux HCTs qui ont plus d'affinité

pour le shikimate que pour le quinate. Puis le cafféoyl-CoA est associé à un quinate grâce aux HQTs pour former le CQA. Au vu des profils d'expression des différentes HCTs et HQTs (tableau 4) nous pouvons supposer que la synthèse du CQA chez les souches 15 et 28 suit bien la voie décrite par Legrand, en utilisant les HCTs et les HQTs. Pour les souches 12 et 26 il est difficile de discuter sur cette voie de biosynthèse, car ces souches sont peu productives, et que l'on utilise une méthode de quantification relative de l'expression des gènes inter-souches sans avoir de réel témoin pour comparer.

Si l'on essaye de corréler l'expression des gènes et la production en équivalent CQA, nous pouvons constater que la souche 28 dont les gènes impliqués dans la synthèse du CQA sont les plus exprimés, produit le plus d'équivalent CQA. La souche 26 quant à elle est celle qui produit le moins d'équivalent CQA et dont les gènes de la voie sont les moins exprimés. La quantité d'équivalent CQA produite par la souche 12 peut, elle être corrélée à la forte expression du gène *hqt2*. Toutefois ces résultats doivent être confirmés par d'autres approches car nous comparons des expressions relatives avec des productions de métabolites, or certaines fois le niveau d'expression, la quantité de protéines et l'activité enzymatique ne sont pas corrélables.

## Conclusion et perspectives

Depuis le plan de recherche lancé par Napoléon Bonaparte pour utiliser sa racine comme substitut du café, la chicorée est une plante dont la culture est très développée dans la région Hauts-de-France. De nos jours, la recherche sur la chicorée continue dans le but d'améliorer ses propriétés nutritionnelles et gustatives, mais aussi pour explorer son potentiel à produire des molécules thérapeutiques. La chicorée industrielle a la capacité de produire et d'accumuler dans ses racines des esters d'acide caféique, le CQA et le di-CQA. La voie de biosynthèse du CQA est très bien connue chez la chicorée, et fait intervenir des hydroxycinnamoyl-CoA transférases, 2HCTs et 3HQTs, (Legrand et al. 2016) enzymes faisant partie de la famille des BAHD.

De récentes recherches au sein du laboratoire ont permis de mettre au jour un nouveau gène, *sht1*, codant pour une enzyme capable de fixer le p-coumaroyl-CoA sur de la spermidine pour former de la tricoumaroylspermidine, cette enzyme faisant aussi partie de la famille BAHD.

Dans le but de valider la fonction putative de ce gène, nous l'avons inséré, sous le promoteur 35S, dans la chicorée, grâce à *Agrobacterium rhizogenes*. La surexpression d'un gène d'intérêt par cette méthode, chez la chicorée n'avait encore jamais été réalisée. Après une caractérisation moléculaire des différentes souches de chevelus racinaires obtenues, nous avons montré que 67% d'entre elles ont intégré le gène *sht1*, ce qui est concordant avec les travaux menés chez *Rauwolfia serpentina* (Mehrotra et al 2013). Les analyses transcriptomiques de 12 des souches ayant intégré le gène ont montré la surexpression de celui-ci, ce qui montre que la technique de surexpression d'un gène après transformation par *Agrobacterium rhizogenes* fonctionne bien chez la chicorée. En revanche les analyses biochimiques n'ont montré aucune production significative de tricoumaroylspermidine chez les chevelus racinaires, même après élévation au MeJa ou à l'ergostérol.

L'hypothèse posée par la doctorante Delporte localisant l'enzyme de la SHT1 dans la paroi des cellules nous a conduit à mettre en culture les chevelus racinaires en présence de spermidine. Après analyse des milieux de culture un pic ayant les caractéristiques (temps de rétention, spectre) de la tricoumaroylspermidine a été mis en évidence. Dans le but de pouvoir caractériser celui-ci par spectroscopie de masse, la méthode de séparation HPLC doit être optimisée pour d'obtenir une meilleure résolution au niveau de ce pic. De plus les expériences doivent être reproduites pour vérifier si cette production est répétable ce qui pourrait permettre de valider l'hypothèse de la localisation pariétale de l'enzyme SHT1 ainsi que sa fonction putative.

Par ailleurs, de nombreux chevelus racinaires transformés avec la souche 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes* ont généré des bourgeons, la régénération de ces bourgeons en plante est possible (Bogdanovic et al 2013). De ce fait après obtention de plantes, on peut supposer qu'une analyse biochimique des boutons pourrait permettre de mettre en évidence une surproduction significative de tricoumaroylspermidine chez les plantes ayant intégré le gène *sht1* par rapport à des boutons de plantes ne l'ayant pas intégré. Cette expérience pourrait être complémentaire à la validation fonctionnelle de ce gène.

La qPCR réalisée sur les 4 souches sélectionnées avait pour but d'obtenir des données pour mieux comprendre les mécanismes intervenant dans la surproduction de CQA et de di-CQA au sein des chevelus racinaires. Pour cela deux gènes de référence ont été sélectionnés pour pouvoir réaliser la quantification relative des gènes d'intérêt étudiés. Nous avons pu constater que les gènes intervenant dans la voie de signalisation du jasmonate étaient

fortement exprimés chez les souches transformées avec la souche 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Or ces souches étaient celles dont la production de di-CQA était la plus faible ce qui n'est pas concordant avec le fait qu'une élicitation au MeJA de cultures cellulaires de chicorée accroît très fortement la production de di-CQA.

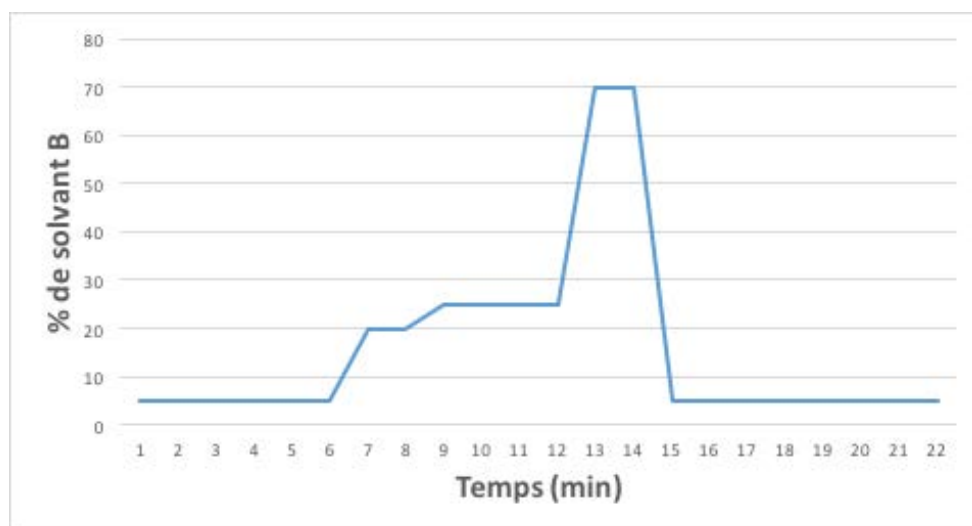
Les profils d'expression des gènes *hcts/hqts* ont montré que les souches produisant le plus de CQA et di-CQA étaient celles qui exprimaient le plus ces gènes. L'expression des gènes *hct* a de nouveau validé le passage par le caféoy-CoA avant la production de CQA (Legrand et al. 2016). En revanche la non expression des deux gènes codant pour les deux lipases au sein des chevelus racinaires, invalide un peu plus leur supposée implication dans la synthèse de di-CQA. Pour confirmer cette invalidation, une expérience de qPCR sur des cultures cellulaires de chicorée élicitées au méthyljasmonate pourrait venir compléter ces résultats.

En ce qui concerne la production en di-CQA, certaines souches transformées avec la souche 2659 d'*Agrobacterium rhizogenes* ont montré des productions en di-CQA avoisinant les 15% de masse sèche. Il serait donc intéressant de pouvoir régénérer des plantes à partir de ces chevelus racinaires. Pour cela il est possible de jouer sur les balances hormonales des milieux de culture (Crane et al. 2006). Une fois les plantes régénérées celles-ci peuvent être petit à petit ré-acclimatées au milieu naturel. On peut supposer que ces plantes provenant de chevelus racinaires posséderont un système racinaire très dense. Une fois à l'état naturel, si elles produisent toujours des concentrations en di-CQA élevées dans leurs racines, et étant donné que des plantes transformées par *Agrobacterium rhizogenes* ne sont pas considérées comme OGM *sensus stricto* (Bogdanovic et al. 2014), il pourrait être intéressant de leur appliquer la technologie mise au point par « Plant Advanced Technologies » dans le but de produire à échelle industrielle du di-CQA.

Notre étude a donc montré que la technique de surexpression fonctionnant chez les chevelus racinaires de chicorée de nouvelles perspectives pour la validation de gènes en cours de caractérisations chez la chicorée sont envisageables.

## Annexe I

Gradient d'élution du solvant B utilisé pour la séparation des acides hydroxycinnamiques. Solvant A : EUP+0,1% d'acide orthophosphorique. Solvant B : Acetonitrile+0,1% d'Acide orthophosphorique. La somme des proportions en solvants A et B est égale à 100%.



## Annexe II

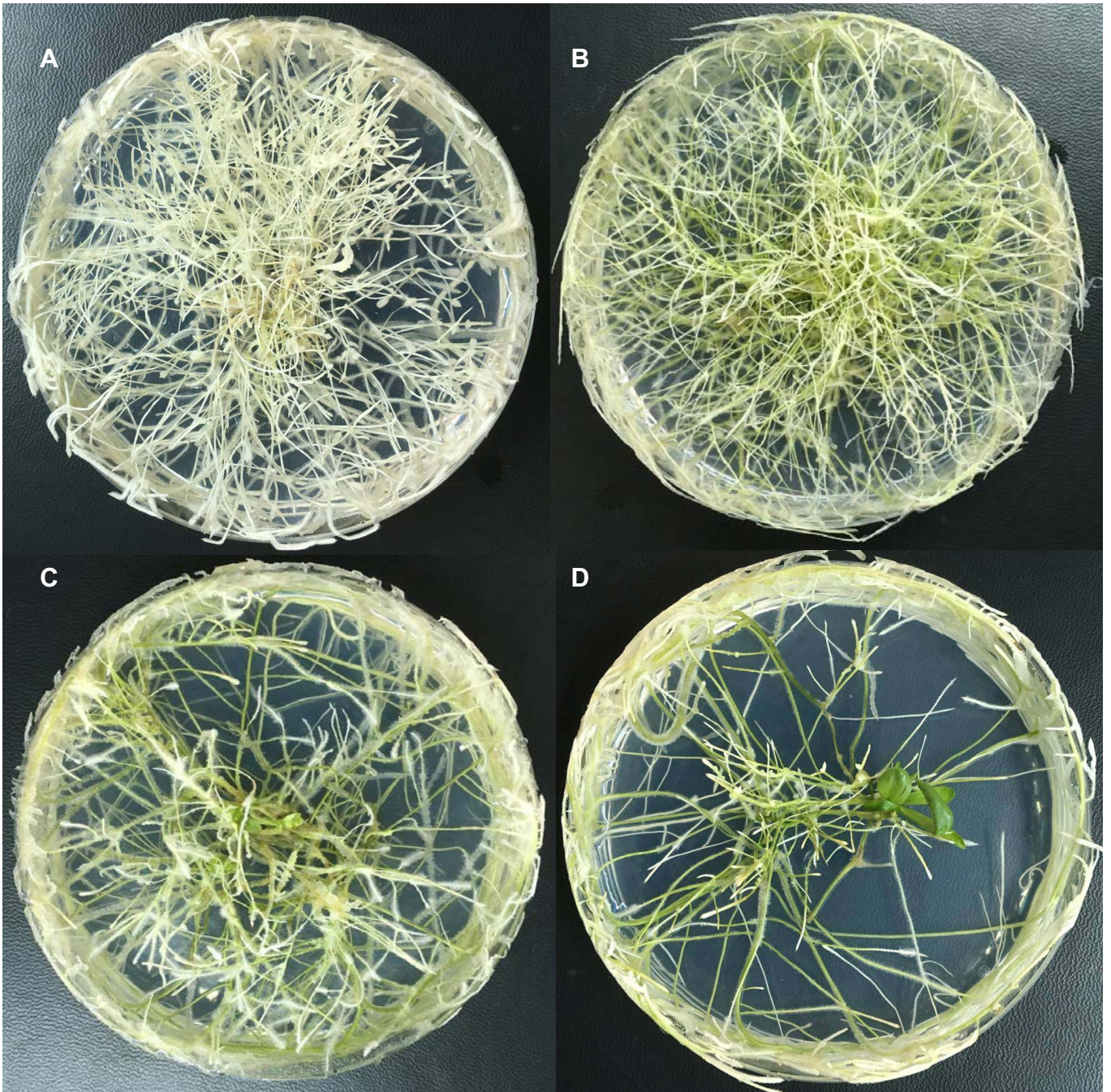
Description des gènes de référence. T<sub>m</sub>=melting Temperature

gène	description	Taille amplicon	T <sub>m</sub>	Efficacité
<i>ubq10</i>	Ubiquitin 10	177pb	81°C	99,3%
<i>act2</i>	Actin 2	119pb	84°C	102%
<i>tip41</i>	Tip41 like protein	100pb	83,5°C	93,2%
<i>ubc</i>	Ubiquitin conjugating enzyme	125pb	79,5°C	99,1%
<i>prof</i>	Profilin	104pb	81°C	83%
<i>sand</i>	SAND family protein	149pb	82°C	104,9%
<i>clath</i>	Clathrin adaptator complex subunit	128pb	80,5°C	91%
<i>pip2a</i>	Prot phosphatase 2A subunit A2	128pb	82,5°C	93,9%



## Annexe III

*Photos caractéristiques de la morphologie des chevelus racinaires 4 semaines après repiquage. A : Orchies+2659 B ; B : clone17 + 2659 ; C : Orchies + 15834 ; D : clone17 + 15834*



## BIBLIOGRAPHIE

- Abid, M., Palms, B., Derycke, R., Tissier, J. P. & Rambour, S.** Transformation of chicory and expression of the bacterial *uidA* and *nptII* genes in the transgenic regenerants. *J. Exp. Bot.* **46**, 337–346 (1995).
- Altamura, M. M.** *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolD* genes: Regulation and involvement in plant development. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **77**, 89–101 (2004).
- Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F.** Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**, 5245–5250 (2004).
- Bais, H. P., Dattatreya, B. S. & Ravishankar, G. A.** Production of volatile compounds by hairy root cultures of *Cichorium intybus* L under the influence of fungal elicitors and their analysis using solid-phase micro extraction gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 769–774 (2003).
- Bais, H. P., Govindaswamy, S. & Ravishankar, G. A.** Enhancement of growth and coumarin production in hairy root cultures of witloof chicory (*Cichorium intybus* L.cv. Lucknow local) under the influence of fungal elicitors. *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 648–653 (2000).
- Bogdanović, M. D., Todorović, S. I., Banjanac, T. & Dragičević, M. B.** Production of guaianolides in *Agrobacterium rhizogenes* - transformed chicory regenerants flowering in vitro. *Ind. Crops Prod.* **60**, 52–59 (2014).
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. & Gontier, E.** Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Sci.* **161**, 839–851 (2001).
- Bulgakov, V. P.** Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.* **26**, 318–324 (2008).
- Chandra, S.** Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes* : Role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Lett.* **34**, 407–415
- Crane, C., Wright, E., Dixon, R. A. & Wang, Z. Y.** Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* **223**, 1344–1354 (2006).
- D'Auria, J.** Acyltransferases in plants : a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**, 331–340
- Dadakova, K., Klempova, J., Jendrisakova, T., Lochman, J. & Kasparovsky, T.** Elucidation of signaling molecules involved in ergosterol perception in tobacco. *Plant Physiol. Biochem.* **73**, 121–127 (2013).
- Delporte, M., Legrand, G., Hilbert, J.-L. & Gagneul, D.** Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in *Cichorium intybus*. *Front. Plant Sci.* **6**, 1–11 (2015).
- Fang, C., Yu, Y., Chen, W., Jian, X. et al.** Role of allene oxide cyclase in the regulation of rice phenolic acids synthesis and allelopathic inhibition on barnyard grass. *Plant Growth Regul.* **79**, 265–273 (2015).



- Fellenberg, C., Ziegler, J., Handrick, V. & Vogt, T.** Polyamine Homeostasis in Wild Type and Phenolamide Deficient *Arabidopsis thaliana* Stamens. *Front. Plant Sci.* **3**, 1–11 (2012).
- Fuentes, E. & Palomo, I.** Mechanisms of endothelial cell protection by hydroxycinnamic acids. *Vascul. Pharmacol.* **63**, 155–161 (2014).
- Grienenberger, E., Besseau, S. & Geoffroy, P.** A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J.* **58**, 246–259 (2009).
- Hellens, R., Mullineaux, P. & Klee, H.** Technical Focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* **5**, 446–451 (2000).
- Inês, M., João, M., Alves, R. C. & Ferreira, I. C. F. R.** Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds : A review. *Ind. Crop. Prod.* **82**, 9–22 (2016).
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R. & He, X.** Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J. Pharm. Pharmacol.* **2**, 377–392 (2014).
- Kusch, U., Greiner, S., Steininger, H. Meyer, A.D.** Dissecting the regulation of fructan metabolism in chicory (*Cichorium intybus*) hairy roots. *New Phytol.* **184**, 127–140 (2009).
- Lallemand, L. A., Zubieta, C., Lee, S. G. et al. A** Structural Basis for the Biosynthesis of the Major Chlorogenic Acids Found in Coffee. *Plant Physiol.* **160**, 249–260 (2012).
- Legrand, G., Delporte, M., Khelifi, C. et al.** Identification and characterization of five BAHD acyltransferases involved in hydroxycinnamoyl ester metabolism in chicory. *Front. Plant Sci.* **7**, 741 (2016).
- Lindbo, J. A.** High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. *BMC Biotechnol.* **7**, 52 (2007).
- Liu, C, Z. Abbasi, B, H. Gao, H. Murch, J. Saxena, P, K.** Caffeic Acid Derivatives Production by Hairy Root Cultures of *Echinacea purpurea*. *J. Agric. Food Chem.* **54** 8456–8460 (2006).
- Malarz, J., Stojakowska, A. & Kisiel, W.** Effect of methyl jasmonate and salicylic acid on sesquiterpene lactone accumulation in hairy roots of *Cichorium intybus*. *Acta Physiol. Plant.* **29**, 127–132 (2007).
- Malarz, J., Stojakowska, A. & Kisiel, W.** Long-term cultured hairy roots of chicory - A rich source of hydroxycinnamates and 8-deoxylactucin glucoside. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 1589–1601 (2013).
- Maroufi, A., Van Bockstaele, E. & De Loose, M.** Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* **11**, 15 (2010).
- Pandino, G., Lombardo, S., Moglia, A. et al.** Leaf polyphenol profile and SSR-based fingerprinting of new segregant *Cynara cardunculus* genotypes. *Front. Plant Sci.* **5**, 800 (2014).
- Mehrotra, S., Srivastava, V., Rahman, L. U. & Kukreja, A. K.** Overexpression of a Catharanthus tryptophan decarboxylase (*tdc*) gene leads to enhanced terpenoid indole alkaloid (TIA) production in transgenic hairy root lines of *Rauwolfia serpentina*. *Plant Cell. Tiss. Organ Cult.* **115**, 377–384 (2013).

- Murashige, T et Skoog, F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497 (1962).
- Niggeweg, R., Michael, A. J. & Martin, C.** Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.* **22**, 746–754 (2004).
- Pfaffl, M. W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P.** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**, 509–515 (2004).
- Rasmussen, M. K., Klausen, C. L. & Ekstrand, B.** Regulation of cytochrome P450 mRNA expression in primary porcine hepatocytes by selected secondary plant metabolites from chicory (*Cichorium intybus* L.). *Food Chem.* **146**, 255–263 (2014).
- Skala, E., Kicel, A., Olszewska, M. A., Kiss, A. K. & Wysokinska, H.** Establishment of hairy root cultures of rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin for the production of biomass and caffeic acid derivatives. *Biomed Res. Int.* **2015**, page 15 (2015).
- Street, R. A., Sidana, J. & Prinsloo, G.** *Cichorium intybus* : Traditional Uses , Phytochemistry , Pharmacology , and Toxicology. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2013**, 13 (2013).
- Thwe, A. Arasu, M. V., Li, X., Park, C. H. et al.** Effect of Different *Agrobacterium rhizogenes* Strains on Hairy Root Induction and Phenylpropanoid Biosynthesis in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn ). *Front. Microbiol.* **7**, 1–10 (2016).
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B. & Citovsky, V.** *Agrobacterium* T-DNA integration: Molecules and models. *Trends Genet.* **20**, 375–383 (2004).
- Vandesompele, J. De Preter, K. Pattyn, F. et al.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 34 (2002).
- Veena, V. Taylor, C.** *Agrobacterium rhizogenes* : recent developments and promising applications *Russ. In vitro Cell. Dev. Biol-Plant.* **43**, 383–403 (2007).
- Walters, D., Meurer-Grimes, B. & Rovira, I.** Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**, 255–258 (2001).
- Yang, C., Chen, M. & Zeng, L. et al.** Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing *pmt* and *h6h* genes. *Plant Omics* **4**, 29–33 (2011).
- Zhou, Y., Sun, W. & Chen, J. et al.** Sm MYC2a and Sm MYC2b played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. *Sci. Rep.* **6**, 22852 (2016).
- Zillich, O. V, Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. & Kersch, M.** Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *Int. J. Cosmet. Sci.* **37**, 455–464 (2015).

**Guillaume BERNARD, 2016. Surexpression d'un gène (*sht1*) codant pour une SpermidineHydroxycinnamoylTransférase dans des souches transformées de chevelus racinaires de chicorée. Etude biochimique et transcriptomique.**

Equipe Adaptation aux stress et qualité des végétaux, Institut Charles Viollette, Université de Lille 1, bâtiment SN2, 59650 Villeneuve d'Ascq, France.

**Résumé :** La chicorée (*Cichorium intybus*) a la capacité d'accumuler dans ses racines 2 composés phénoliques, les acides chlorogénique (CQA) et isochlorogénique (di-CQA). La voie de biosynthèse du CQA est bien connue et fait intervenir 2 HCTs et 3 HQTs, enzymes appartenant à la famille des BAHD. Chez la chicorée, des analyses phylogénétiques complétés par des analyses biochimiques *in vitro* ont permis d'identifier une SpermidineHydroxycinnamoylTransférase (SHT1) faisant partie de la même famille d'enzymes. Dans le but de valider la fonction putative du gène *sht1* celui-ci a été surexprimé dans des souches transformées de chevelus racinaires de chicorée en utilisant la souche 2659 et 15834 d'*Agrobacterium rhizogenes*. Des analyses transcriptomiques ont montré que le gène était bien surexprimé. En revanche les analyses biochimiques, même après élicitation au Meja et à l'ergostérol n'ont pas mis en évidence la production de tricoumaroylspermidine. De plus, afin de comprendre l'impact de la transformation par *Agrobacterium rhizogenes* sur la production du CQA et du di-CQA, des analyses transcriptionnelles par qPCR ont été réalisées sur deux gènes impliqués dans la voie de signalisation de jasmonate, sur 7 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du CQA et sur deux lipases candidates à la synthèse de di-CQA.

**Mots clés :** Surexpression, *Agrobacterium rhizogenes*, chevelus racinaires, chicorée, qPCR, acide hydroxycinnamique.

---

**Guillaume BERNARD, 2016. Overexpression of a SpermidineHydroxycinnamoylTransferase (*sht1*) gene in a transgenic hairy root lines of chicory. Transcriptional and biochemical analyses.**

Equipe Adaptation aux stress et qualité des végétaux, Institut Charles Viollette, Université de Lille 1, bâtiment SN2, 59650 Villeneuve d'Ascq, France.

**Abstract :** Chicory (*Cichorium intybus*) has the capacity to accumulate in its roots 2 phenolic compounds such as the chlorogenic acid (CQA) and the isochlorogenic acid (di-CQA). 2 HCTs and 3 HQTs, enzymes belonging to the BAHD family, are involved in the CQA biosynthesis pathway. Phylogenetic and biochemical analyses revealed a SpermidineHydroxycinnamoylTransferase (SHT1) also belonging to the BAHD family. In order to validate the putative function of the *sht1* gene, this one has been overexpressed in a transgenic hairy root lines of chicory with the *Agrobacterium rhizogenes* strains, 2659 and 15834. The transcriptomic analyses showed that *sht1* has been well overexpressed. But biochemical analyses, didn't have shown tricoumaroylspermidine production, also after Meja and ergosterol elicitation. Moreover, in order to understand the *Agrobacterium rhizogenes* transformation impact on the CQA and di-CQA production, transcriptomic analyses with qPCR have been made on two genes involved in the jasmonate signalisation pathway, seven genes involved in the hydroxycinnamic acids pathway and two genes supposed involved in the di-CQA synthesis.

**Keys words:** Overexpression, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy root, chicory, qPCR hydroxycinnamic acids.