



## 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](mailto: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.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 des Ressources Naturelles"  
Unité Mixte de Recherche 1121 Université de Lorraine-INRAE  
Laboratoire Agronomie et Environnement

## Thèse

en vue de l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine en Sciences Agronomiques**  
présentée par

**Marwa Roumani**

Les phénolamides de la tomate : développement d'une approche d'ingénierie métabolique pour l'étude de leurs fonctions *in planta*, et évaluation de leurs activités biologiques.

Thèse soutenue publiquement le 01 juin 2021 devant un jury composé de :

Nathalie Gonzalez	DR, INRAE, Bordeaux	Rapportrice
Jean-Louis Hilbert	PR, Université de Lille	Rapporteur
Nathalie Giglioli-Guivarc'h	PR, Université de Tours	Examinateuse
Dominique Laurain-Mattar	PR, Université de Lorraine	Examinateuse
Romain Larbat	CR, INRAE, Nancy	Co-directeur
Christophe Robin	DR, INRAE, Nancy	Directeur



*À toi, mon inspiration, « Mahdy » Aba Saleh...*



## Remerciements

Tout d'abord, je remercie Madame Nathalie Gonzalez, directrice de recherche INRAe, et M. Jean-Louis Hilbert, professeur à l'université de Lille, pour le temps consacré à évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je souhaite également remercier Madame Nathalie Giglioli-Guivarc'h, professeure à l'université de Tours, et Madame Dominique Laurain-Mattar, professeur à l'université de Lorraine, d'avoir accepté d'être les examinatrices de cette thèse.

Pour tous les remerciements de suite je vais utiliser le français de « Marwa », donc désolée pour les phrases pas bien formulées mais j'espère que vous allez comprendre. C'est le tour de mes encadrants, Christophe Robin directeur du laboratoire LAE et chargé de recherche à l'INRAe, et Romain Larbat chargé de recherche à l'INRAe. Mes chefs, j'aimerais vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir fait confiance pour ce sujet de thèse, j'ai eu de la chance de vous avoir comme encadrants et je suis reconnaissante pour vous. Christophe, merci pour toutes tes conseils, merci pour le temps que tu m'as accordé sachant tes grandes occupations en tant que directeur du labo, de me garder parmi tes priorités, et pour toutes les petites leçons de français. Romain, merci pour toute sa disponibilité, ta gentillesse, les « YALLA » et les expressions qui me remontaient le moral. Merci pour tous les samedis que tu venais avec moi pour regarder les résultats. Et enfin mes deux chefs merci pour chaque seconde que vous avez passé à me corriger le manuscrit. Je tiens à remercier aussi Alain Hehn pour sa gentillesse et ses conseils. Je remercie aussi Armand Guckert pour toutes les belles histoires de la Syrie et du Moyen-orient qui me rappelées la chaleur de mon pays le Liban.

Allez les filles c'est à vous maintenant, Cloé, Yuka, Andréina, merci pour être des chères amies. Cloé, ma patate pourrie, je ne peux pas éviter mes larmes en t'écrivant cela, du coup je vais être rapide. Merci pour être ma sœur, merci pour m'aider à bien m'exprimer en français (je précise language familier..Tu sais bien je parle de quoi..) et les mots de « Molière » que tu me sortais de je ne sais pas d'où, mais le plus important est que tu es une des raisons pourquoi j'aime la France. Je te promets ma meilleure amie que nous allons travailler ensemble la recherche dans le futur. Yuka (and Ryosuke sensei) thank you for all your precious advices, thank you for coming with me weekends to the lab, for your kindness and for the smiles you drawed on my face. Andréina, je sais très bien qui aller voir lorsqu'e je ne me sens pas bien, tu es toujours là pour donner le confort. Lucile ma nouvelle collègue du bureau (violet) merci pour la bonne humeur et tout les repas de midi ensemble. Je passe vers les filles de PAT « Girls power », Ludivine (collègues 2 ans du

bureau et une sœur), Cindy, Sissi et Carole je vous aime beaucoup les filles, juste entendre vos bruits dans les couloirs me suffisais pour commencer la journée en souriant.

Aude, Clément, Julie et Jérémy, vous avez pensé que j'allais vous oublier ? Clément merci pour toutes les belles aventures de biologie moléculaire, les chocolats, le français rapide, les réponses sur mes trois milles questions par jour sans râler et surtout merci pour être unique. Aude merci pour tout le soutien et l'aide pendant les trois années de thèse, travailler avec les tomates était amusant grâce à toi, merci pour accepter mes bêtises (et celles de Cloé je n'étais pas la seule, à chaque fois c'était le « duos du choc », toutes les deux s'il y a des bêtises). Julie, l'arc en ciel du labo avec les belles couleurs de tes cheveux, et super woman pour tous ce qui est négociations, merci pour les belles discussions, ah et oui biensûr, c'est important ça : merci de m'apprendre des mots de français utiles que je peux utiliser seulement quand je dois râler et que même google avait du mal à les définir. Jérémy merci pour tous ce qui est organisation UPLC et ta gentillesse à répondre à mes questions. Je remercie beaucoup Claude pour tout l'aide technique dans la serre, les phytotrons, ainsi que les informations sur l'histoire de la France.

Alexandre, Alan, Séverine, Sophie, Gianni, Xie, Gaël, Jodie, Nadia, Alice et beinsûr les deux petits du labo Omar et mini Alex, merci pour les discussions, les beaux moments et la gentillesse. Pour vous tous, tous les membres du labo merci pour être ma famille en France, et m'accueillir parmi vous sans me faire sentir que je suis étrangère. Un énorme MERCI.

Enfin je remercie ma famille papa, maman, ma soeur malgré les difficiles moments où vous me manquez beaucoup, j'ai pu finir ces trois années de thèse grâce à votre support moral, vous étiez et resterez le refuge de mon âme, sans vous je ne serais pas là et je ne pouvais pas le faire. À vous que je rêve pouvoir vous mettre dans ma valise et vous prendre partout où j'y vais, à la libanaise : « fadelkon ma ra7 enseh kil 3omreh ». And you, my beloved one, thank you for being there for me, I could never be more blessed.

# Sommaire

<b>Remerciements</b> .....	<b>5</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>14</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>17</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>18</b>
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b> .....	<b>2</b>
<b>A- Les métabolites spécialisés des plantes</b> .....	<b>3</b>
1. Les plantes synthétisent une grande diversité de métabolites spécialisés.....	3
1.1. Classification.....	3
1.2. Voies de biosynthèses .....	6
1.2.1. Voie du shikimate .....	6
1.2.2. Voie des isoprénoides .....	7
1.2.3. Voie des polycétides.....	7
2. Les métabolites spécialisés ont de nombreux rôles fonctionnels avérés dans la plante.....	9
2.1. Défense des plantes.....	9
2.2. Reproduction des plantes.....	9
2.3. Communication entre les plantes .....	10
3. L'identification des fonctions des métabolites spécialisés : des enjeux scientifiques majeurs...10	
<b>B- Les phénolamides</b> .....	<b>11</b>
1. Biosynthèse et classification.....	11
2. Rôles biologiques des phénolamides .....	14
2.1. Rôle dans la reproduction.....	14
2.1.1. Initiation florale et fertilité .....	15
2.1.2. Constituants de la paroi de grains de pollen .....	15
2.2. Rôles protecteurs contre les stress biotiques.....	16
2.2.1. Agents pathogènes .....	16
2.2.2. Insectes .....	18
2.3. Rôle protecteur contre les stress abiotiques .....	19
3. Régulation de la synthèse des phénolamides dans les plantes .....	20
<b>C- Le modèle tomate</b> .....	<b>25</b>
1. La tomate, une culture mondiale de première importance.....	25

2.	Un modèle majeur pour les études scientifiques.....	26
3.	La culture de tomate est soumise à une forte pression parasitaire .....	26
4.	<i>Tuta absoluta</i> , un ravageur spécialiste des Solanacées .....	27
5.	Quelles solutions pour le contrôle de <i>T. absoluta</i> ? .....	28
5.1.	Diverses solutions contre <i>T. absoluta</i> .....	28
5.2.	Lutte chimique, biopesticides .....	29
5.3.	A la recherche des traits de résistance dans des espèces sauvages.....	29
5.4.	Des pratiques culturales agissent sur la résistance de la plante à <i>T. absoluta</i> .....	31
D-	Objectifs et stratégies de ma thèse .....	32
Chapitre 2 : Identification de gènes contrôlant l'accumulation de phénolamides dans les tomates..		35
1.	Préambule .....	36
2.	Introduction .....	37
2.1.	L'accumulation de phénolamides en réponse à l'herbivorie fait intervenir la voie JA et plusieurs facteurs de transcription chez <i>N. attenuata</i> .....	37
2.2.	N-hydroxycinnamoyl-transférases et diversité des phénolamides .....	38
3.	Matériels et méthodes .....	42
3.1.	Matériel biologique .....	42
3.2.	Matériel génétique.....	43
3.3.	Amplification des gènes candidats .....	45
3.4.	Migration sur gel d'agarose et récupération des fragments d'ADN .....	46
3.5.	Constructions des vecteurs de surexpression.....	46
3.6.	Transformation transitoire des tomates par agro-infiltration sous vide.....	50
3.7.	Infiltration des substrats dans les tomates .....	51
3.8.	Infestation des tomates transformées par <i>T. absoluta</i> .....	51
3.9.	Récolte et broyage de matière fraîche.....	52
3.10.	Extraction des ARN des plantes transformées.....	52
3.11.	PCR quantitative (qPCR) .....	52
3.12.	Extraction des phénolamides.....	53
3.13.	Constructions pour l'expression des enzymes transférases .....	53
3.14.	Induction et production des protéine transférases .....	56
3.15.	Extraction et purification des protéines transférases .....	56
3.16.	Test d'incubation enzymatique .....	57
3.17.	Préparation des esters de CoenzymeA.....	57
3.18.	SDS-PAGE .....	58

<b>3.19. UPLC-MS.....</b>	<b>59</b>
<b>3.20. Analyses statistiques.....</b>	<b>59</b>
<b>4.Résultats .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. Identification des gènes candidats impliqués dans l'accumulation de phénolamides chez la tomate.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1.1. Identification par BLAST protéique .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1.2. Etude du niveau d'expression de gènes candidats dans les feuilles de tomates soumises à l'herbivorie de <i>T. absoluta</i> .....</b>	<b>62</b>
<b>4.2. Identification des gènes codant pour des enzymes N-hydroxycinnamoyl transférasées impliquées dans la voie de biosynthèse de phénolamides chez la tomate .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3. Expression des protéines transférasées .....</b>	<b>64</b>
<b>4.3.1. Clonage et construction des vecteurs d'expression des transférasées .....</b>	<b>64</b>
<b>4.3.2. Production et purification des protéines transférasées.....</b>	<b>64</b>
<b>4.4. Tests d'activité enzymatique .....</b>	<b>66</b>
<b>4.5. Validation des activités <i>in vivo</i> des gènes par transformation transitoire des tomates.....</b>	<b>67</b>
<b>4.5.1. Clonage et construction des vecteurs de surexpression .....</b>	<b>67</b>
<b>4.5.2. Validation des activités <i>in vivo</i> des gènes par transformation transitoire des tomates .....</b>	<b>68</b>
<b>4.6. L'accumulation des phénolamides dans la plante nécessite-t-elle plus de 4 jours pour être observable ? Etude cinétique de la corrélation entre la surexpression de <i>SiPHT1</i> et l'accumulation de caféoylputrescine.....</b>	<b>72</b>
<b>4.7. La quantité de substrats nécessaires à la synthèse de caféoylputrescine dans les plantes est-elle insuffisante ? Influence de l'infiltration des substrats dans les tomates qui surexpriment le gène <i>SiPHT1</i> sur l'accumulation de caféoylputrescine .....</b>	<b>73</b>
<b>4.8. L'herbivorie de <i>T. absoluta</i> en combinaison avec la surexpression de la <i>SiPHT1</i> peut-elle conduire à une suraccumulation de la caféoylputrescine dans les plantes transformées ? .....</b>	<b>75</b>
<b>5. Discussions .....</b>	<b>77</b>
<b>5.2. ...mais n'a pas permis de valider clairement le rôle de ces gènes <i>in vivo</i> .....</b>	<b>77</b>
<b>5.3. L'absence de l'accumulation de phénolamide pourrait-elle être dûe à une mauvaise expression des protéines ? .....</b>	<b>79</b>
<b>5.4. Identification de huit gènes candidats codant pour une spermine/spermidine acyltransférase mais pas de confirmation d'activité.....</b>	<b>80</b>
<b>Chapitre 3 : Création de lignées de tomate génétiquement modifiées pour l'accumulation de phénolamides .....</b>	<b>84</b>
<b>1.Préambule .....</b>	<b>85</b>
<b>2.Introduction .....</b>	<b>86</b>
<b>2.1. Principe du système CRISPR/Cas .....</b>	<b>89</b>

2.2. Types de CRISPR/Cas .....	90
2.3. Mécanisme du CRISPR Cas9 chez les bactéries.....	91
2.4. Transition du CRISPR/Cas9 bactérien en outil d'édition génétique.....	92
2.5. Application chez les plantes.....	93
2.6. Types de mutants générés .....	93
2.7. Travaux réalisés dans ce chapitre .....	94
3. Matériels et méthodes .....	94
3.1. Matériels biologiques .....	94
3.2. Matériels génétiques.....	95
Les plasmides .....	97
3.3. Constructions CRISPR-Cas9 .....	98
3.3.1. Outil bio-informatique : CRISPOR.....	98
3.3.2. Construction des sgRNA .....	100
3.3.3. Migration sur gel d'agarose et purification des sgRNA.....	101
3.3.4. Système Golden Gate .....	101
3.3.5. Rassemblement des plasmides de niveau 1 (LVL1).....	102
3.3.6. Rassemblements dans le plasmide final pAGM4723, niveau 2 (LVL2).....	104
3.3.7. Transformation des agrobactéries avec la construction finale CRISPR/Cas9 .....	105
3.4. Transformation et régénération des plantes tomate <i>in vitro</i> .....	106
3.4.1. Solutions stocks utilisées dans les milieux de culture .....	106
3.4.2. Milieux de régénération .....	106
3.4.3. Stérilisation des graines .....	108
3.4.4. Manipulation des cotylédons .....	108
3.4.5. Conditionnement des agrobactéries.....	108
3.4.6. Transfection des cotylédons par <i>A. tumefaciens</i> .....	109
3.4.7. Régénération des cotylédons.....	109
3.4.8. Préparation des plantules pour l'enracinement .....	109
3.4.9. Acclimatation et culture des tomates transgéniques .....	110
3.5. Identification des plantes transgéniques .....	110
3.5.1. Extraction de l'ADN génomique .....	110
3.5.2. Amplification par PCR (génotypage) .....	110
3.5.3. Clonage dans pCRT <sup>TM</sup> 8/GW/TOPOT <sup>TM</sup> .....	111
3.5.4. Séquençage .....	111
4.Résultats .....	111

<b>4.1. Constructions CRISPR/Cas9.....</b>	<b>111</b>
4.1.1. Construction des sgRNA .....	111
4.1.2. Rassemblement Golden Gate.....	112
4.2. Transformation et régénération des tomates à partir des cotylédons .....	114
4.3. Culture des plantes transgéniques dans le phytotron .....	116
4.4. Identification des plantes T0 transgéniques .....	117
4.4.1. Génotypage par PCR des plantes transgéniques de surexpression.....	117
4.4.2. Génotypage par PCR des plantes transgéniques CRISPR/Cas9.....	119
4.4.3. Identification de mutation créé par séquençage .....	122
5.Discussion.....	128
5.1. La génération des transformants a nécessité un travail de mise au point technique important .....	128
5.3. La technique de transformation développée présente une grande efficacité .....	130
5.4. Solyc06g083900.2 est-il réellement impliqué dans la régulation de la voie des phénolamides ? .....	131
<b>Chapitre 4 : Evaluation de propriétés biologiques de phénolamides de tomate induits par l'herbivorie de <i>T. absoluta</i> .....</b>	<b>133</b>
1.Préambule .....	134
2.Introduction .....	135
2.1. Activité anti-inflammatoire des phénolamides .....	136
2.1.1. Processus d'inflammation.....	136
2.1.2. Rôles anti-inflammatoires.....	138
2.2. Activité antimicrobienne des phénolamides.....	139
2.3. Activité anti-cancéreuse des phénolamides .....	139
2.4. Activités thérapeutiques connus de quelques phénolamides présents chez la tomate.....	141
2.5. Evaluation des propriétés thérapeutiques des phénolamides de tomate induits par l'herbivorie de <i>T. absoluta</i> .....	142
3.Matériels et méthodes .....	144
3.1. Matériels biologiques : .....	144
3.2. Préparation des extraits qui accumulent les phénolamides.....	145
3.3. Biosynthèse du N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine .....	147
3.3.1. Infestation des tomates par <i>T. absoluta</i> .....	147
3.3.2. Lyophilisation des échantillons et broyage.....	147
3.3.3 Extraction des composés phénoliques à partir des échantillons lyophilisés .....	148
3.3.4. Purification de N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine par HPLC.....	148

<b>3.4. Chimiosynthèse de N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine .....</b>	<b>149</b>
<b>3.5. Tests antibactériens.....</b>	<b>150</b>
<b>3.6. Tests anti-inflammatoires .....</b>	<b>150</b>
<b>3.6.1. Obtentions des macrophages humains .....</b>	<b>151</b>
<b>3.6.2. Incubation des macrophages avec les extraits/LPS .....</b>	<b>151</b>
<b>3.6.3. Tests de cytotoxicité cellulaire avec le cristal violet.....</b>	<b>152</b>
<b>3.6.4. Technique ELISA et détermination de la production de TNF<math>\square</math> des THP-1 différenciées .....</b>	<b>152</b>
<b>3.7. Modification des conditions de cultures des tomates .....</b>	<b>153</b>
<b>4.8. Analyses statistiques.....</b>	<b>153</b>
<b>4.Résultats .....</b>	<b>154</b>
<b>4.1. Synthèse du N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine par la tomate.....</b>	<b>154</b>
<b>4.1.1. Optimisation des conditions de cultures.....</b>	<b>154</b>
<b>4.1.2. Optimisation de l'âge de plantes .....</b>	<b>155</b>
<b>4.1.3 Purification de N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine issue de plantes .....</b>	<b>156</b>
<b>4.3. Tests antibactériens de kukoamine A, de CP et de phénolamides présents dans des extraits bruts de feuilles .....</b>	<b>158</b>
<b>4.4. Tests de cytotoxicité et anti-inflammatoire sur les cellules THP-1 différenciées en macrophages.....</b>	<b>159</b>
<b>4.4.1. Tests de cytotoxicité et tests anti-inflammatoires avec les extraits bruts .....</b>	<b>159</b>
<b>4.4.2. Tests de cytotoxicité et tests anti-inflammatoires avec la caféoylputrescine et la kukoamine A .....</b>	<b>161</b>
<b>5. Discussion.....</b>	<b>163</b>
<b>5.1. La N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine est apparue comme une molécule difficile à produire en quantité avec le système Tomate/ <i>T. absoluta</i> .....</b>	<b>163</b>
<b>5.2. Les phénolamides testés présentent une faible activité antibactérienne.....</b>	<b>164</b>
<b>5.3. Les composés phénoliques de l'extrait brut présentent des effets anti-inflammatoires potentiels .....</b>	<b>165</b>
<b>5.4. CP présente des effets anti-inflammatoires potentiels décrits pour la première fois .....</b>	<b>166</b>
<b>Chapitre 5 : Discussions générales et perspectives .....</b>	<b>168</b>
<b>1. Compréhension de la voie de biosynthèse des phénolamides du plant de tomate .....</b>	<b>169</b>
<b>1.1. Solyc06g083900.2, un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la voie des phénolamides ? .....</b>	<b>169</b>
<b>1.2. Existe-t-il d'autres gènes candidats d'une nouvelle spermine transférase chez la tomate ? .....</b>	<b>170</b>
<b>2. Création des lignées de tomate transgéniques par régénération <i>in vitro</i> .....</b>	<b>171</b>

3. L'analyse des tomates transformées permettra de mieux comprendre les mécanismes de défense contre <i>T. absoluta</i> .....	172
4. Ciblage des activités thérapeutiques des phénolamides du plant tomate : à la recherche de nouvelles molécules bioactives .....	172
<b>Références</b> .....	174
<b>Annexes</b> .....	192
<b>Annexe 1</b> .....	192
1. Séquences ADNc des gènes ciblés .....	192
2. Description des gènes candidats transférases (SHT) : .....	197
3. Carte du plasmide pCRT <sup>TM</sup> 8/GW/TOPOT <sup>TM</sup> .....	199
4. Carte du plasmide pGWB2 Gateway binary vector (BioVector NTCC Inc.).....	199
5. Carte du plasmide pET-28a .....	200
6. Préparation des <i>E.coli</i> MC1022 électrocompétentes.....	200
7. Préparations des Agrobactéries EHA105 électrocompétentes .....	200
8. BLAST nucléotidique pour NaMYB8 .....	201
9. BLAST nucléotidique pour NaMYC2 .....	202
6.10. UPLC.....	202
<b>Annexe 2</b> .....	206

## Liste des figures

Figure 1 : Exemples de structure de quelques terpénoïdes .....	4
Figure 2 : Exemples de structure de quelques phénylpropanoïdes.. .....	5
Figure 3 : Exemples de structure de quelques alcaloïdes et métabolites contenant du soufre .....	6
Figure 4 : Les principales voies de biosynthèse des métabolites spécialisés chez les plantes.....	8
Figure 5 : Biosynthèse des phénolamides.. .....	12
Figure 6 : Mécanisme de régulation de l'accumulation des phénolamides dans les cellules végétales suite à l'infection par des pathogènes. ....	22
Figure 7 : Régulation des phénolamides par l'herbivorie .....	24
Figure 8 : Le pathosystème Tomate/ <i>T. absoluta</i> .....	28
Figure 9 : Chromatogramme des phénolamides induits dans les feuilles de plant de tomate infestés par <i>T.absoluta</i> .....	31
Figure 10: La structuration de mes travaux de thèse avec l'objectif en rouge.....	34
Figure 11 : Dans ce chapitre je cherche à trouver des gènes (codants pour des facteurs de transcription et des enzymes) .....	37
Figure 12 : Mécanisme de régulation de l'accumulation de la caféoylputrescine et autres phénolamides chez <i>N. attenuata</i> .....	38
Figure 13 :Biosynthèse des phénolamides .....	38
Figure 14 : Classification des enzymes N-hydroxycinnamoyl transférases.....	40
Figure 15 : Mélange réactionnel et programme pour la PCR avec prémix de PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 2X.....	45
Figure 16 : Mélange réactionnel et programme pour la PCR avec prémix de SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 2X.....	47
Figure 17 : Construction des vecteurs de surexpression .....	49
Figure 18 : Montage de l'infiltration sous vide des jeunes plants de tomate. ....	50
Figure 19 : Infestation des feuilles de tomate par <i>T. absoluta</i> .....	51
Figure 20 : Les différentes étapes de la construction des plasmides d'expression des candidats transférase.....	55
Figure 21 : Les gènes dont la séquence protéique présente des homologies avec la protéine du gène NaMYB8 chez la tomate par BLAST sur le génome de la tomate .....	60
Figure 22 : Les gènes dont la séquence protéique présente des homologies avec la protéine du gène NaMYC2 chez la tomate par BLAST sur le génome de la tomate .....	61
Figure 23 : Les constructions dans le vecteur pET28-a des gènes de transférases .....	64
Figure 24 : Photos de gel de SDS-PAGE. ....	66
Figure 25 : Les constructions de surexpression dans le vecteur pGWB2 .....	68
Figure 26 : Les moyennes des RQ du niveau d'expression des gènes <i>S/PHT1</i> , <i>S/PHT2</i> et solyc06g083900.2 .....	69
Figure 27 : Profil des chromatogrammes UPLC-MS en analyse SIM sur un échantillon de feuille transformé transitoirement avec <i>S/PHT1</i> . ....	70
Figure 28 : Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les feuilles des plantes qui surexpriment solyc06g083900.2 .....	71

<b>Figure 29 :</b> Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les tiges des plantes qui surexpriment solyc06g083900.2 .....	71
<b>Figure 30 :</b> Moyennes des RQ du niveau d'expression du gène <i>SIPHT1</i> dans les plantes qui surexpriment <i>SIPHT1</i> (1,2,3) .....	73
<b>Figure 31 :</b> Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les feuilles des plantes qui surexpriment <i>SIPHT2</i> après 4 jours de transformation .....	74
<b>Figure 32 :</b> Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les feuilles locales (FL) et systémiques (FS) des plantes de tomate infestées par <i>Tuta</i> surexprimant <i>SIPHT1</i> ( <i>SIPHT1</i> ) .....	76
<b>Figure 33 :</b> Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les tiges locales (TL) systémiques (TS) des plantes de tomate infestées par <i>T.AbsolutePath</i> surexprimant <i>SIPHT1</i> .....	76
<b>Figure 34 :</b> Mécanisme de réparation des DSB .....	88
<b>Figure 35 :</b> Différents éléments du locus CRISPR .....	90
<b>Figure 36 :</b> Mécanisme CRISPR/Cas9 bactérien. ....	92
<b>Figure 37 :</b> Logiciel crispor.....	99
<b>Figure 39 :</b> Réaction PCR pour construire la sgRNA .....	101
<b>Figure 40 :</b> Système Golden Gate pour le rassemblement du vecteur final CRISPR Cas9.. .....	102
<b>Figure 41 :</b> Rassemblement niveau LVL1 Golden Gate. ....	104
<b>Figure 42 :</b> Rassemblement niveau LVL2 Golden Gate. ....	105
<b>Figure 43 :</b> Manipulation des cotylédons. ....	108
<b>Figure 44 :</b> Séparation de la plantule à partir du cal.....	109
<b>Figure 45 :</b> Les séquences ciblées par sgRNA pour chaque gène. ....	112
<b>Figure 46 :</b> Photo du gel d'agarose des sgRNA .....	112
<b>Figure 47 :</b> Rassemblement Golden Gate.....	113
<b>Figure 48 :</b> Régénération des tomates à partir des cotylédons <i>in vivo</i> .....	115
<b>Figure 49 :</b> Explants avec des malformations <i>in vitro</i> . ....	116
<b>Figure 50 :</b> Culture des plantes transgéniques dans le phytotron. ....	117
<b>Figure 51 :</b> Hybridation des amorces par rapport au T-DNA surexpression .....	118
<b>Figure 52 :</b> Génotypage par PCR des tomates transgéniques en surexpression.....	118
<b>Figure 53 :</b> Hybridation des amorces par rapport au T-DNA CRISPR/ cas9 .....	120
<b>Figure 54 :</b> Génotypage par PCR des tomates transgéniques qui surexpriment les gènes ciblés. ....	121
<b>Figure 55 :</b> Amplification par PCR pour le séquençage.....	122
<b>Figure 56 :</b> Quelques résultats de séquençage des plantes T0.....	124
<b>Figure 57 :</b> Quelques résultats de comparaison de séquences protéiques entre les allèles édités et l'allèle sauvage (WT). .....	125
<b>Figure 58 :</b> Amplification des constructions de surexpression à partir de l'ADNg des plantules T1. ....	127
<b>Figure 59 :</b> Niveau d'expression du gène solyc06g083900.2 dans les différentes plantules T1 ..	127
<b>Figure 60:</b> Structure des phénolamides. ....	136
<b>Figure 61:</b> Réponse des macrophages à un stimulus comme le LPS (polysaccharide).....	137
<b>Figure 62 :</b> L'inflammation induit l'activation de la voie des kinases .....	138
<b>Figure 63:</b> Les étapes de la démarche de recherche du chapitre 4. ....	144

Figure 64 : Chromatogramme des analyses UPLC de la teneur en phénolamides de l'extrait LN-T.....	146
Figure 65 : Infestation des tomates avec des larves de <i>T. absoluta</i> pour induire la biosynthèse de la molécule TDHC spermine.....	147
Figure 66 : Broyage des échantillons avec le broyeur à bille.....	148
Figure 67 : Synthèse de TDHC spermine (N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl)spermine.....	149
Figure 68 : Comparaison de l'accumulation des phénolamides dans les différentes parties des plantes infestées par <i>T. absoluta</i> .....	155
Figure 69 : Accumulation des phénolamides dans les feuilles (F) et les tiges (T) des plantes infestées par <i>T. absoluta</i> à différents âges.....	156
Figure 70 : Différentes étapes d'obtention de la molécule N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl)spermine .....	157
Figure 71 : Résultats des tests de viabilité au cristal violet pour les extraits bruts .....	159
Figure 72 : Résultats des tests ELISA pour les extraits bruts.....	160
Figure 73 : Résultats des tests de viabilité au cristal violet de la caféoylputrescine.....	161
Figure 74 : Résultat des tests ELISA de la caféoylputrescine.....	162
Figure 75 : Résultats des tests de viabilité au cristal violet de la kukoamine A.....	162
Figure 76 : Résultat des tests ELISA de la kukoamine A.....	163
Figure 77 : Les gènes homologues à <i>NaMYB8</i> chez la tomate par BLAST nucléotidique.....	201
Figure 78 : Les gènes homologues à <i>NaMYC2</i> chez la tomate par BLAST nucléotidique.....	202
Figure 79 : Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les feuilles locales (FL) et systémiques (FS) des plantes de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> .....	203
Figure 80 : Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les tiges locales (TL) et systémiques (TS) des plantes de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> .....	204
Figure 81 : Chromatogramme d'UPLC de la teneur en phénolamides des extraits bruts.....	205

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des phénolamides selon l'origine de leurs enzymes.....	14
Tableau 2 : Amorces utilisées. ....	44
Tableau 3 : Solutions utilisées pour l'infiltration des plantes .....	51
Tableau 4 : Le classement et niveau d'expression (au bout de 5h et 24h d'herbivorie) des gènes homologues à NaMYB8 et NaMYC2. ....	62
Tableau 5 : Les gènes candidats pour des spermine et spermidine transférases .....	63
Tableau 6 : Les différents substrats utilisés et les produits attendus .....	67
Tableau 7 : Comparaison entre les différents outils d'édition génétique. ....	89
Tableau 8 : <i>Différentes amorces utilisées dans ce chapitre</i> .....	96
Tableau 9 : Produits utilisés pour la préparation des milieux .....	106
Tableau 10 : Compositions des milieux pour la culture <i>in vitro</i> de la variété <i>Ailsa Craig</i> .....	107
Tableau 11 : Compositions des milieux pour la culture <i>in vitro</i> de la variété <i>WVa106</i> .....	107
Tableau 12 : Les différentes constructions CRISPR/Cas9.....	114
Tableau 13 : Plantes T0 transgéniques régénérées pour la surexpression.....	119
Tableau 14 : Plantes T0 transgéniques régénérées pour la CRISPR/Cas9.....	122
Tableau 15 : Types de plantes T0 régénérées par édition génétique .....	123
Tableau 16 : Types de plantes T0 régénérées par édition génétique .....	126
Tableau 17 : Activité anti-cancer des phénolamides .....	141
Tableau 18 : Les phénolamides majoritaires de tomate induits par l'herbivorie de <i>T. absoluta</i> ..	142
Tableau 19 : Différents extraits utilisés pour les premiers tests de criblage d'activités thérapeutiques.....	145
Tableau 20 : Teneur en phénolamides pour chaque extrait brut.....	146
Tableau 21 : Solutions d'incubation et traitement des macrophages.....	152
Tableau 22 : Activités antibactériennes de la kukoamine A et de la caféoylputrescine. ....	158
Tableau 23 : Masse des différentes molécules .....	203

## Liste des abréviations

<b>2,4-D</b> : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	<b>CP</b> : caféoylputrescine
<b>3-DHS</b> : 3-dehydroshikimate	<b>CRISPR/Cas9</b> : type II clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9
<b>4CL</b> : CoA-ligase	<b>CrRNA</b> : CRISPR RNAs transcript mature
<b>ACT</b> : Agmatine coumaroyl transférase	<b>CYT</b> : cytokinine
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>D.O</b> : densité optique
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>DAMP</b> : diméthylallyl phosphate
<b>ADN-T</b> : ADN de transfert	<b>DAT</b> : transporteur actif de la dopamine
<b>AGO8</b> : protéine Argonaute 8	<b>DHC spermidine</b> : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine
<b>AIA</b> : acide indole 3-acétique ou IAA	<b>DHD</b> : 3-dehydroquinate déhydratase
<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique	<b>DLC3 et DLC4</b> : protéines de type DICER
<b>BAHD</b> : superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases	<b>DMPAPP</b> : diméthylallyl diphosphate
<b>BAP</b> : 6-Benzylaminopurine,	<b>DSB</b> : coupure du double brin d'ADN
<b>BET</b> : Bromure d'éthidium	<b>DTT</b> : Dithiothréitol
<b>BLAST</b> : Basic local alignment search tool	<b>DTX18</b> : transporteur Detoxification 18
<b>C3'H</b> : <i>p</i> -coumarate 3' hydroxylase	<b>EDTA</b> : Éthylènediaminetétraacétique
<b>C4H</b> : cinnamate 4-hydroxylase	<b>ERF</b> : famille de facteur de transcription
<b>C6</b> : 6 atomes de carbone	<b>ET</b> : Ethylene response facor
<b>CA</b> : acide chlorogénique	<b>FAOSTAT</b> : Food and Agriculture Organization of the United Nations statistical Databases
<b>Cas9</b> : protéine Cas9	<b>FD</b> : feruloyl dopamine
<b>CEVD</b> : Citrus Exocotris Viroid	<b>FL</b> : feuilles locales
<b>CGT</b> : glucarate caféoyltransférase	<b>FP</b> : feruloylputrescine
<b>CHT</b> : chalcone synthase	<b>FPKM</b> : Fragments per kilo base per million mapped reads
<b>CoA</b> : coenzyme A	<b>FS</b> : feuilles systémiques
<b>CoAg</b> : <i>p</i> -coumaroyl agmatine	<b>FT</b> : feruloyl tyramine
<b>CoD</b> : <i>p</i> -coumaroyl dopamine	<b>G3P</b> : glycéraldéhyde 3-phosphate
<b>CoN</b> : <i>p</i> -coumaroyl noradrénaline	<b>GNAT</b> : N-acétyltransférases liées à GCN <sub>5</sub>
<b>CoOc</b> : <i>p</i> -coumaroyl octopamine	<b>GSH</b> : dérivés du glutathion
<b>CoP</b> : <i>p</i> -coumaroyl putrescine	<b>GSLs</b> : glucosinolates
<b>CoT</b> : <i>p</i> -coumaroyl tyramine	
<b>COV</b> : composés volatils	

<b>GUS</b> : b-glucuronidase	<b>MS</b> : milieu Murashig et skoog
<b>HCT</b> : Shikimate/ quinate hydroxycinnamoyl transférases	<b>MYB</b> : Famille de facteurs de transcription
<b>HDR</b> : réparation dirigée par homologie	<b>MYC</b> : Famille de facteurs de transcription
<b>HNH</b> : nucléase domaine de la protéine Cas9 qui coupe le brin complémentaire du crRNA	<b>N</b> : azote
<b>HR</b> : réponse hypersensible	<b>NaAT1, NaDH29, NaCV86</b> : enzymes N acyltransférases
<b>HSP</b> : protéine de choc thermique	<b>NAC</b> : famille de facteur de transcription NAM, ATAF et CUC
<b>IDI</b> : isopentényl-pyrophosphate delta isomérase	<b>NHEJ</b> : jonction des extrémités non homologues
<b>Ile</b> : isoleucine	<b>NPR1</b> : protéine régulatrice
<b>INRAe</b> : Institut National de la Recherche Agronomique et environnement	<b>NUC</b> : nucleaqse lobe de la cas9
<b>IPP</b> : isopentényl diphosphate	<b>ORA</b> : famille de facteurs de transcription
<b>IPTG</b> : Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside	<b>P</b> : phosphate
<b>JA</b> : acide jasmonique	<b>PAL</b> : Phénylalanine ammonia lyase
<b>JA-Ileu</b> : jasmonyl-isoleucile	<b>PAM</b> : Protospacer Adjacent Motif
<b>JAZ</b> : jasmonate-ZIM-domain protein	<b>Pb</b> : paire de base
<b>K</b> : potassium	<b>PBS</b> : tampon phosphate salin
<b>kDa</b> : KiloDalton	<b>PCR</b> : Réaction en chaîne par polymérase
<b>KOH</b> : hydroxide de potassium	<b>PEP</b> : D-erythrose-4-phosphate et du phosphoénolpyruvate
<b>Kuko A/B</b> : Kukoamine A et B.	<b>PHT</b> : Putrescine hydroxycinnamoyl transférase
<b>LAE</b> : Laboratoire Agronomie et Environnement	<b>PKS</b> : polycétides synthases
<b>LB</b> : milieu lysogeny broth	<b>POD</b> : polyphénols péroxidases
<b>MAP kinase</b> : Mitogen-activated protein kinase	<b>PPO</b> : polyphénols oxydases
<b>MATE</b> : toxines multiples	<b>Pre-crRNA</b> : CRISPR RNA transcript
<b>MBP</b> : maltose binding protein	<b>PS8</b> : tampon de phosphate de sodium 50Mm et chlorure de sodium 300Mm, PH=8
<b>MeJA</b> : méthyl-jasmonate	<b>qPCR</b> : PCR quantitative
<b>MEK</b> : Mitogen-activated protein kinase kinase	<b>REC</b> : recognition lobe de la cas9
<b>MEP</b> : méthylérythritol phosphate	<b>ROS</b> : Reactive Oxygen Species
<b>MES</b> :acide2-(Nmorpholino) éthanosulfonique.	<b>RVUC</b> : nucléase domaine de la protéine cas9 qui coupe le brin non complémentaire du crRNA
<b>MNs</b> : méganucléases	<b>SA</b> : acide salicylique
<b>MR1, MR2, MR3 et MR4</b> : extrait brut de tomate	<b>SDS</b> : Dodécylsulfate de sodium

**SgRNA** : guide ARN (single guide RNA)

**SHT** : spermidine hydroxycinnamoyl transférase

**SmHT** : spermine hydroxycinnamoyl transférase

**SSN** : nucléases spécifiques

**TAE**: Tris acétate EDTA

**TAL**: tyrosine ammonia lyase

**TALE Ns**: nucléases effecteurs type TAL

**TBSV-P19**: Tomato bushy stunt virus protein 19

**TDHC spermine**: N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine.

**TEMED**: tétraméthyléthylènediamine

**THT**: tyramine Hydroxycinnamoyl transférase

**Timentin** : Ticarcilline et Clavulanate

**Tm** : Température de fusion

**Tracr-RNA**: trans-activating crispr RNA

**TSWV**: Tomato Spotted Wilt Virus

**UPLC-MS** : Ultra Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry

**UV** : Ultraviolet

**WRKY** : Famille de facteurs de transcription

**X-Gal**: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

**ZFNs** : nucléases à doigt de Zinc

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

## A- Les métabolites spécialisés des plantes

### 1. Les plantes synthétisent une grande diversité de métabolites spécialisés

Les plantes synthétisent des molécules organiques de faibles poids moléculaires (entre 100 et 1000 Da) (Breinbauer et al., 2002) essentielles dans leurs interactions avec l'environnement (Hartmann, 1996; Pagare et al., 2015; Böttger et al., 2018). Appelées métabolites spécialisés ou métabolites secondaires, ces molécules sont très diversifiées avec plus 100 000 molécules différentes identifiées à ce jour (Hadacek, 2002; Dictionary of Natural Products 29.1 Chemical Search).

#### 1.1. Classification

Les métabolites spécialisés sont répartis en 3 grandes classes: les terpénoïdes (ou isoprénoïdes), les phénylpropanoïdes (ou composés phénoliques) et les métabolites contenant de l'azote (alcaloïdes) ou du soufre (glucosinolates) (Verpoorte, 2000; Pagare et al., 2015).

Les **terpénoïdes** ou isoprénoïdes représentent la classe la plus grande et la plus diversifiée de métabolites spécialisés avec 40 000 molécules identifiées jusqu'à présent (Tholl, 2015). Leur structure de base est une unité isoprène (5 carbones) (**Figure 1**). Selon le nombre d'isoprène dans la molécule, on détermine plusieurs familles de terpénoïdes (hémiterpènes à 5 C, monoterpènes à 10 C, sesquiterpènes à 15 C, diterpènes, sesteterpènes et triterpènes...) (Stevens, 1992; David Hoffmann, 2003) (**Figure 1**). Certains terpénoïdes sont catégorisés comme hormones (gibberellines, acide abscissique, brassinostéroïdes), pigments (caroténoïdes) ou polymères (latex). Les terpénoïdes volatils (mono- et sesquiterpènes) sont des composants majoritaires des huiles essentielles (Stevens, 1992; Tholl, 2015).

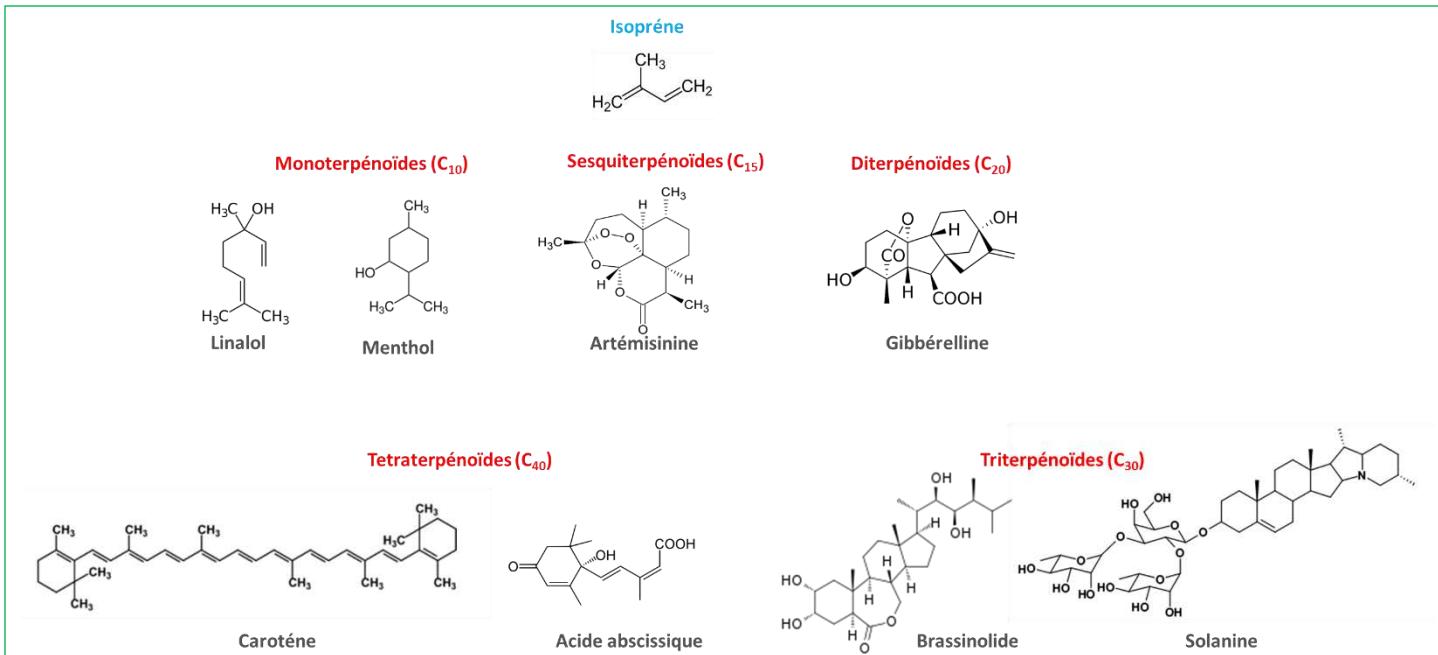


Figure 1 : Exemples de structure de quelques terpénoïdes. En bleu la structure de base, en rouge les familles, en gris les noms des molécules.

Les **phénylpropanoïdes** (ou composés phénoliques) sont caractérisés par la présence d'au moins un groupement phénol dans leur structure (Vogt, 2010) (Figure 2). Ils varient de simples composés aromatiques à des molécules polymériques plus complexes (Pagare et al., 2015). Les composés phénoliques comportent plusieurs familles parmi lesquelles on peut citer les flavonoïdes, avec environ 9 000 molécules connues à ce jour, qui jouent notamment un rôle dans la pigmentation et la défense des plantes (Wang et al., 2011; Singh et al., 2017). Les flavonoïdes possèdent un squelette à quinze atomes de carbone constitué de deux cycles aromatiques ( $C_6$ ) reliés par une chaîne de 3 carbones (Figure 2). Un autre exemple de phénylpropanoïde est la lignine qui représente le deuxième biopolymère le plus abondant sur terre (un des composants du bois) (Liu et al., 2018). La structure de cette molécule est complexe, non linéaire, formée de trois types de monomères (l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapyllique) en différentes proportions selon l'espèce végétale (Liu et al., 2018). Parmi les acides phénoliques des plantes, les acides hydroxycinnamiques représentent des composés ubiquistes qui peuvent être estérifiés à des sucres, des acides organiques ou des composés aminés. L'association des acides hydroxycinnamiques à des composés aminés donne une famille des phénylpropanoïdes appelée phénolamides (Bassard et al., 2010). Elle représente la famille à laquelle je me suis intéressée dans mes travaux de thèse et que je présenterai ultérieurement.

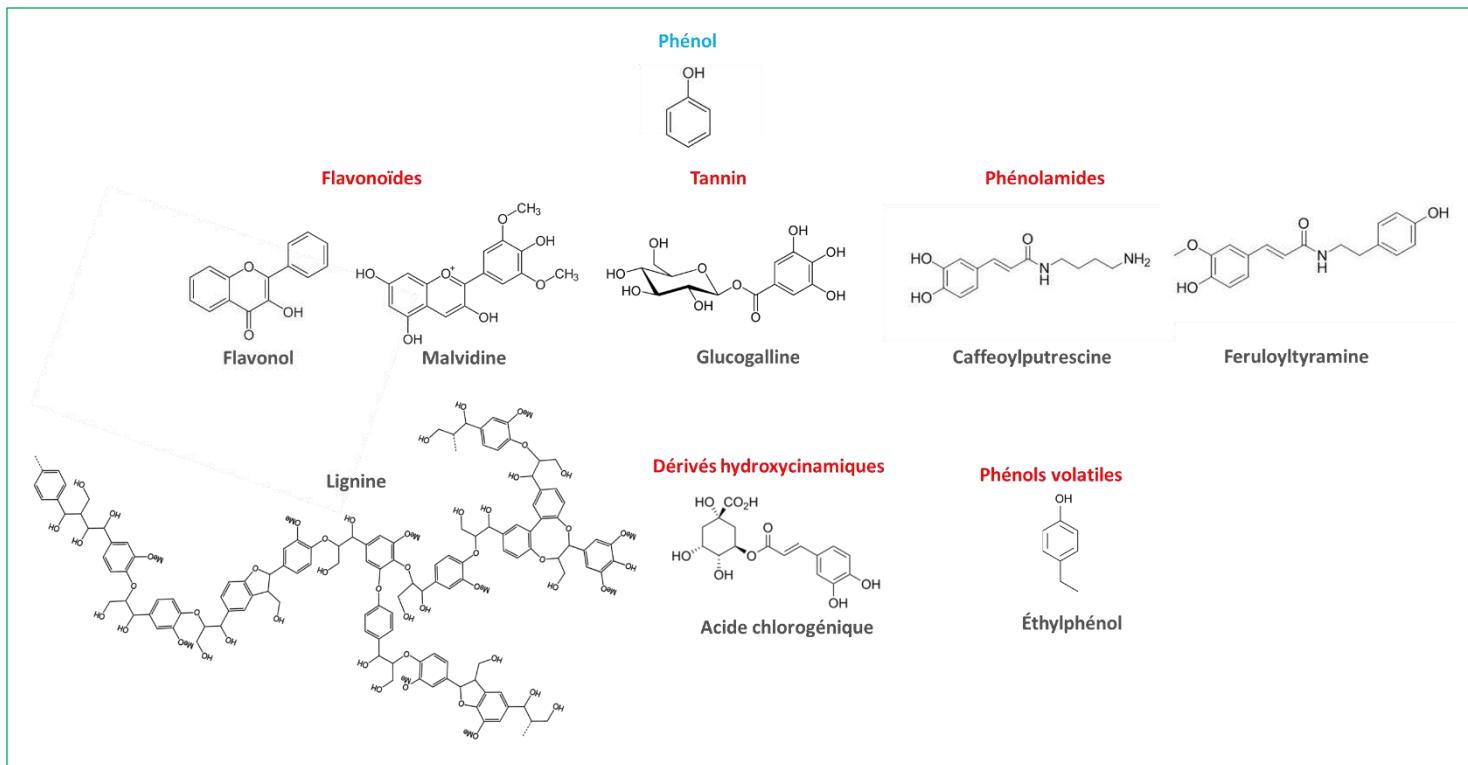
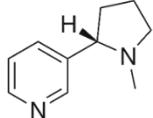


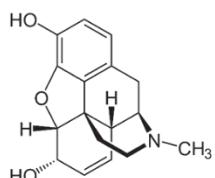
Figure 2 : Exemples de structure de quelques phénylpropanoïdes. En bleu la structure de base, en rouge les familles, en gris les noms des molécules.

La dernière classe contient les **alcaloïdes**, molécules hétérocycliques légèrement basiques et solubles dans l'eau. Les différents alcaloïdes ne partagent qu'un seul point commun : la présence d'une ou plusieurs molécules d'azote dans leur structure (Hadacek, 2002; Böttger et al., 2018) (Figure 3). Un autre groupe de cette classe, les **composés contenant du soufre**, comprennent les glucosinolates (GSLs), les dérivés du glutathion (GSH) et les thionines (Pagare et al., 2015) (Figure 3). Les GSLs sont les plus diversifiés ; ils sont composés d'un groupement glucoside ( $\beta$ -D-thioglucoside) d'un groupement (Z) -N-hydroximinosulfate et d'une chaîne latérale variable (groupement R-amino acids) (Mikkelsen et al., 2004; Miękus et al., 2020).

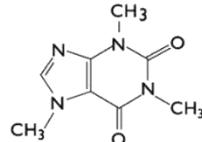
### Alcaloïdes



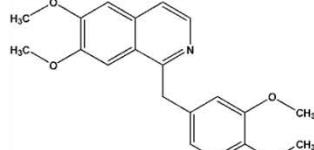
Nicotine



Morphine

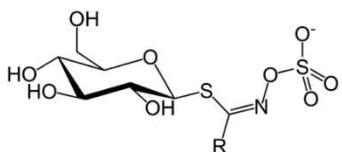


Caféine

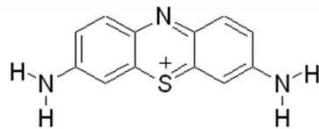


Papavérine

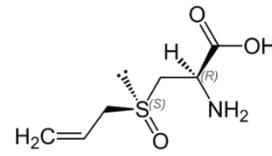
### Métabolites contenant du soufre



Glucosinolate



Thionine



Alliine

Figure 3 : Exemples de structure de quelques alcaloïdes et métabolites contenant du soufre.

## 1.2. Voies de biosynthèses

La plupart des métabolites spécialisés chez les plantes émanent de trois voies de biosynthèse : la voie du shikimate, la voie des isoprénoïdes et celle des polycétides (Verpoorte et al., 2000; Pagare et al., 2015).

### 1.2.1. Voie du shikimate

La voie du shikimate est à l'origine d'un grand nombre de composés aromatiques. Elle a pour origine la condensation du D-erythroose-4-phosphate et du phosphoénolpyruvate (PEP) aboutissant au shikimate puis au chorismate (Bentley and Haslam, 1990; Verpoorte et al., 2000) (Figure 4). A partir du chorismate, la voie se scinde en plusieurs branches parmi lesquels 3 sont essentielles : celles menant à la phénylalanine, à la tyrosine et à l'anthranilate qui donne du tryptophane (Bentley and Haslam, 1990). Ces trois acides aminés aromatiques constituent le point de départ de la biosynthèse des phénylpropanoïdes (Dixon and Paiva, 1995; Vogt, 2010; Deng and Lu, 2017). La phénylalanine est convertie en acide cinnamique, sous l'action de l'enzyme phénylalanine ammonia lyase (PAL), qui donne ensuite l'acide *p*-coumarique sous l'action de la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) (Deng and Lu, 2017) (Figure 4). A partir de l'acide *p*-coumarique, la synthèse de l'acide caféïque est catalysée par la *p*-coumarate 3' hydroxylase (C3'H) (Chen et al., 2011). Des esters coA qui entrent dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes sont

synthétisés sous l'action de la 4-coumaroyl : CoA-ligase (4CL) (Deng and Lu, 2017). Chez quelques monocotylédones, la tyrosine est immédiatement convertie en acide *p*-coumarique en une seule étape par l'intermédiaire de la tyrosine ammonia lyase (TAL) (Watts et al., 2004) (**Figure 4**). Le chorismate donne aussi de la 3-dehydroquinate une quatrième branche qui entre dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Widhalm and Dudareva, 2015). En effet, la 3-dehydroquinate est hydroxylée par l'enzyme 3-dehydroquinate déhydratase (DHD) en 3-dehydroshikimate (3-DHS) et cette dernière donne de l'acide gallique (Muir et al., 2011). L'acide benzoïque dérive aussi de la voie du shikimate et entre dans la synthèse de certains phénylpropanoïdes comme l'acide salicylique (SA) (Lee et al., 1995; Widhalm and Dudareva, 2015) (**Figure 4**).

### 1.2.2. Voie des isoprénoides

Les molécules isopentényl diphosphate (IPP) et diméthylallyl diphosphate (DMAPP) constituent les points de départ de la voie des isoprénoides à partir desquelles les différents types des terpénoïdes sont synthétisés par des enzymes prényltransférases (Verpoorte, 2000) (**Figure 4**). Selon la voie de biosynthèse de l'IPP et du DMAPP, les terpénoïdes peuvent être cytosoliques ou chloroplastiques (Lichtenthaler et al., 1997a; Tholl, 2006, 2015). Ainsi l'IPP / DMAPP issu de la voie du mévalonate donne des terpénoïdes cytosoliques alors que l'IPP/ DMAP issu de la voie du méthylérythritol phosphate (MEP) est chloroplastique (Lichtenthaler et al., 1997a, 1997b). La voie du mévalonate est composée de 7 réactions qui donnent à la fin l'IPP et à partir de laquelle est produite le DAMP par l'action de l'isopentényl-pyrophosphate delta isomérase (IDI) (Chatzivasileiou et al., 2019) (**Figure 4**). La voie du MEP commence par la condensation de quantités égales de pyruvate et de glycéraldéhyde 3-phosphate (G3P) pour produire du DMAPP et de l'IPP, avec un ratio de 5:1 (Kirby and Keasling, 2009; Nagegowda, 2010).

### 1.2.3. Voie des polycétides

La molécule clé de cette voie est l'acétyl-CoA (Verpoorte, 2000). Cette molécule est convertie en malonyl-CoA à partir de laquelle plusieurs réactions de condensation sont catalysées par des enzymes dites polykétides synthases (PKS) (**Figure 4**). Ces réactions vont donner des acides gras et des molécules à l'origine de certains métabolites spécialisés (Verpoorte, 2000; Tsai and Ames, 2009). Le malonyl-CoA contribue aussi à la synthèse de certains métabolites spécialisés en interagissant avec le *p*-coumaroyl-CoA comme les flavonoïdes, les stilbеноïdes ou les benzalacétones (phénylpropanoïdes) (Borejsza-Wysocki and Hrazdina, 1996; Verpoorte, 2000). Plusieurs autres métabolites spécialisés peuvent dériver de cette voie. C'est le cas de la conine (alcaloïde) et des anthraquinones (Verpoorte, 2000). La majorité des alcaloïdes dérivent du

croisement de la voie de polycétides avec la voie shikimate (Figure 4) (Aniszewski, 2015). Les principaux précurseurs des alcaloïdes sont les acides aminés (L-tyrosine, L-lysine, L-phénylalanine, L-arginine, L-ornithine, L-histidine) synthétisés par le métabolisme primaire. Ces derniers peuvent donner des alcaloïdes soit à partir des voies de l'acétate, du shikimate, et du mévalonate (Figure 4) (Aniszewski, 2015).

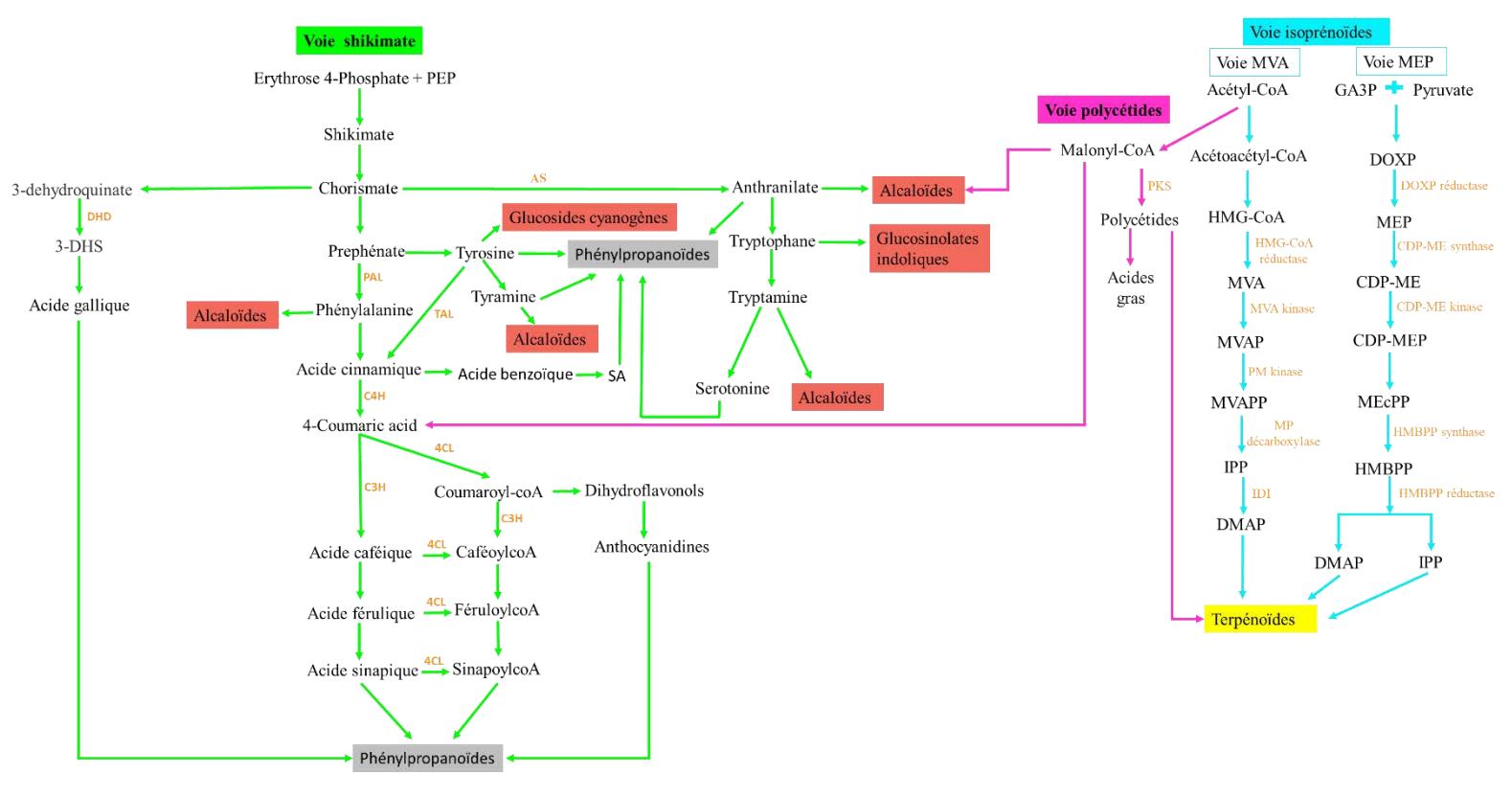


Figure 4 : Les principales voies de biosynthèse des métabolites spécialisés chez les plantes. En vert la voie shikimate, en rose la voie polycétides et en bleu la voie des isoprénoides. Les trois classes des métabolites spécialisés sont représentés dans des cadres en gris les phénylpropanoïdes, en jaune les terpénoïdes et en rouge la classe des alcaloïdes et des composés contenant du soufre. En orange quelques enzymes importantes des différentes voies de biosynthèse. MEP: 2-C-méthyl-D-erythritol 4-phosphate, GA3P: glyceraldehyde-3-phosphate, IPP: isopentényl diphosphate, DMAP: diméthylallyl diphosphate. DXP: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, CDPME2P: 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-erythritol 2-phosphate, HMBPP: 4-hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate, PEP: phosphoénolpyruvate, AS: Anthranilate synthase, DOXP: 1-déoxy-D-xylulose-5-P, MEP: 2-C-méthyl-D-érythritol-4-P, CDP-ME: 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol, CDP-MEP: 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-méthyl-D-érythritol-2-P, MECPP: 2C-méthyl-D-érythritol 2,4- cyclo-diP, MVA: mévalonate, HMG-CoA: 3-hydroxy-3méthylglutaryl-CoA, MVA kinase: mévalonate kinase, MVAP: Mévalonate 5 phosphate, PM kinase: phosphomévalonate kinase, MVAPP: mévalonate diphosphate, MP Décarboxylase: mévalonate pyrophosphate decarboxylase, IDI: isopentényl-pyrophosphate delta isomérase, PAL: phenylalanine ammonia lyase, C4H: cinnamate 4-hydroxylase, C3H: p-coumarate 3 hydroxylase, 4CL: 4 coumaroyl : CoA-ligase, TAL: tyrosine ammonia lyase, DHD: 3-dehydroshikimate déhydratase, 3-DHS: 3-dehydroshikimate, SA: acide salicylique, PKs:polycétides synthase.

## **2. Les métabolites spécialisés ont de nombreux rôles fonctionnels avérés dans la plante**

On suppose qu'au cours de l'évolution, les métabolites spécialisés font partie des mécanismes d'adaptation des plantes à la vie terrestre, mis en place au cours de l'Evolution (Bateman et al., 1998). Par exemple, on suppose que les phénylpropanoïdes sont apparus chez les premières plantes terrestres pour les protéger des rayonnements UV (Lowry et al., 1980). L'acquisition de la capacité de synthèse des lignines et d'autres composés phénoliques chez les plantes vasculaires a permis de les protéger des dégâts causés par le vent ou les herbivores (Bateman et al., 1998). L'apparition des glucosides cyanogéniques coïncide aussi avec l'émergence des insectes (Buchanan et al., 2015). Un certain nombre de fonctions ont été attribuées à des métabolites spécialisés en relation avec la défense des plantes contre des stress biotiques, l'attraction des pollinisateur, la dispersion des graines et la communication entre les plantes (Böttger et al., 2018). Mais beaucoup d'autres fonctions ne sont pas encore identifiées.

### **2.1. Défense des plantes**

Parmi les rôles majeurs des métabolites spécialisés dans la plante, la défense contre les stress biotiques est la plus étudiée (Pagare et al., 2015; Böttger et al., 2018). Un certain nombre de métabolites spécialisés (isoflavonoïdes, terpènes, alcaloïdes, polyphénols) sont induits par des pathogènes et présentent des propriétés antimicrobiennes (Sharma et al., 2017; Chen et al., 2018; García-Calderón et al., 2020). En effet, des études ont montré que certains métabolites spécialisés rentrent dans la réponse hypersensible (HR) des plantes face aux pathogènes (Heath, 2000; Edreva et al., 2008). D'autres composés ont des propriétés insecticides, herbicides ou de répulsion (Hadacek, 2002; Pagare et al., 2015; Hussein and El-Anssary, 2018). Les métabolites spécialisés peuvent également jouer le rôle de réducteurs de digestibilité, sont des toxines, ou modifient le comportement alimentaire des insectes (Duffey and Stout, 1996; Mithöfer and Boland, 2012). Ils contribuent également à la défense indirecte des plantes en attirant les prédateurs de ravageurs (« l'ennemi de mon ennemi est mon ami »). Ainsi, les plantes libèrent des composés volatils (COV) qui attirent les ennemis parasites ou prédateurs du ravageur. Le ravageur constitue alors une source de nutrition pour les prédateurs. Les composés volatils sont donc une arme de défense pour les plantes et un outil de régulation biologique pour l'écosystème (Takabayashi and Dicke, 1996; Ness, 2003; Pagare et al., 2015; Böttger et al., 2018).

### **2.2. Reproduction des plantes**

Les métabolites spécialisés exercent des rôles majeurs dans les fleurs des angiospermes (Tholl et al., 2005; Bassard et al., 2010). Ainsi les monoterpènes et sesquiterpènes sont exprimés

dans le stigmate, l'anthère, le sépale et le nectar chez *Arabidopsis thaliana* (Tholl et al., 2005). Certains, comme les flavonoïdes, attirent des polliniseurs par la pigmentation (Faegri and Pijl, 2013). D'autres métabolites spécialisés attirent les insectes ou d'autres animaux par les arômes (Böttger et al., 2018). Les parfums floraux sont généralement produits par des terpènes (mono- et sesquiterpènes), des dérivés d'acide benzoïque et cinnamique ou des alcaloïdes. (Waterman, 2007; Dudareva et al., 2013). Les odeurs émises par les fleurs de certaines plantes imitent des phéromones d'accouplement ou bien les odeurs de la viande en décomposition (mélanges d'amines et composés cycliques) chez les plantes qui dépendent des mouches ou des coléoptères pour la pollinisation (Leonard and Masek, 2014; Raguso and Weiss, 2015; Wiśniewska et al., 2019).

### **2.3. Communication entre les plantes**

L'utilisation des composés volatils (COV) comme molécules de communication entre les plantes a été démontrée chez plusieurs espèces sous des conditions d'herbivorie, et comme alarme en cas de stress abiotiques (Dudareva et al., 2013; Karban et al., 2014; Böttger et al., 2018). Plusieurs hypothèses sont débattues actuellement, suggérant que les plantes utilisent ces métabolites volatils pour communiquer explicitement avec d'autres plantes voisines, ou pour avertir les prédateurs potentiels de leur statut défensif, ou pour distribuer rapidement le signal de danger de manière systémique dans toute la plante (Pagare et al., 2015; Böttger et al., 2018).

## **3. L'identification des fonctions des métabolites spécialisés : des enjeux scientifiques majeurs**

En plus de leurs fonctions dans les plantes, les métabolites spécialisés présentent un grand intérêt pour l'Homme. Ils ont des effets biologiques majeurs, à la base de l'utilisation des plantes dans la médecine traditionnelle (Hussein and El-Anssary, 2018). Leurs activités biologiques sont liées généralement à leurs structures, ce qui explique leur très grande diversité d'effets thérapeutiques (anti-inflammatoires, anti cancéreux, neuroprotecteurs...) (Seigler, 1998; David Hoffmann, 2003; Yi et al., 2004; Goławska et al., 2014; Hussein and El-Anssary, 2018). La recherche scientifique vise à mieux connaître les fonctions de ces métabolites et comment ils sont synthétisés afin (i) d'augmenter la résistance des plantes aux ravageurs et aux maladies en favorisant l'accumulation de métabolites de défenses dans les tissus (Pagare et al., 2015), (ii) de modifier la qualité d'une plante (couleurs des fleurs, goût, odeur, diminution de la toxicité...) à usage alimentaire ou ornemental (Verpoorte et al., 2000) ou (iii) d'améliorer la production de métabolites d'intérêt économique (médicaments, insecticides, colorants, arômes, parfums) (Verpoorte et al., 2000; Ncube and Van Staden, 2015).

Identifier le ou les rôles physiologiques de métabolites spécialisés est bien souvent une entreprise complexe en raison de la faible concentration de ces métabolites dans les plantes et/ou de leur accumulation parfois très spécifique d'un organe, d'un tissu, d'un stade phénologique ou d'une interaction. Les mutants, naturels ou créés, déficients en métabolites d'intérêt constituent des outils de choix pour ces études. Tout changement phénotypique ou physiologique accompagnant l'absence du métabolite en question, est associé au rôle de ce métabolite. Pour la création de mutant, l'ingénierie génétique cible des gènes en modifiant leur niveau d'expression ; soit en les mettant en silence (par des stratégies d'extinction), ou bien en les surexprimant (Lloyd, 2003; Mao et al., 2019).

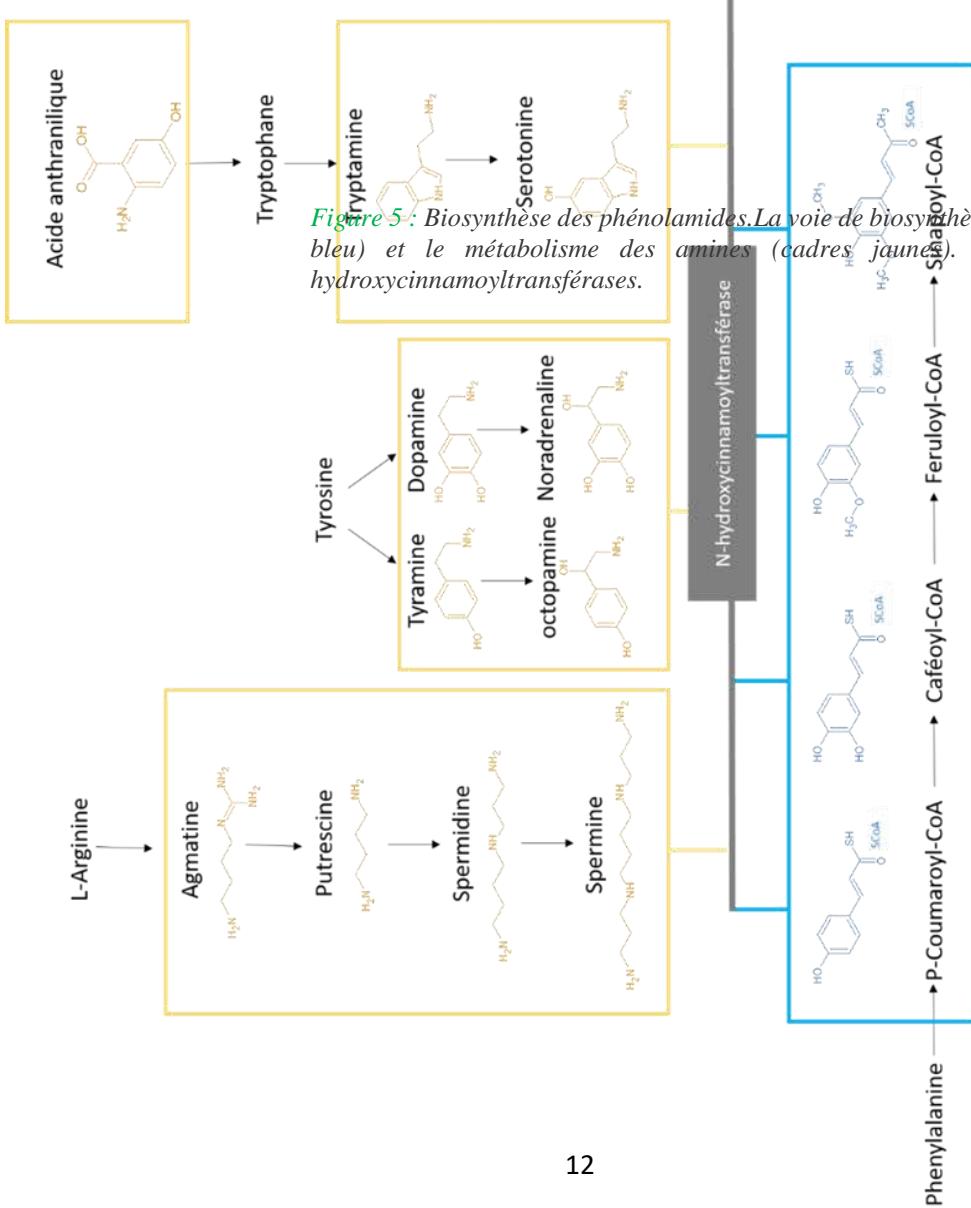
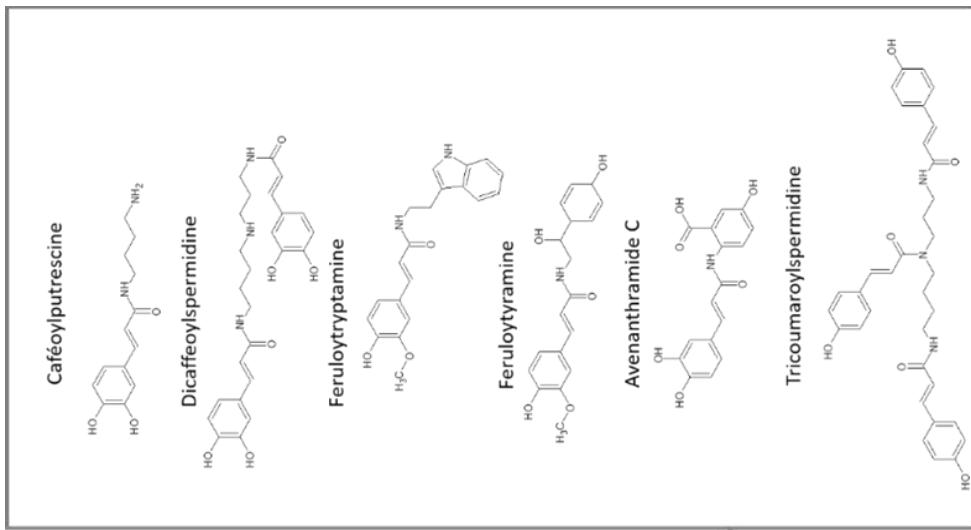
## B- Les phénolamides

Les phénolamides résultent de l'association de groupements phénoliques (principalement acides hydroxycinnamiques et dérivés) liés par des liaisons amide à une monoamine aromatique ou à une polyamine aliphatique (par exemple tyramine, agmatine, anthranilate, spermidine).

La feruloylputrescine a été le premier phénolamide identifié au milieu du XXe siècle (Ryabinine and Ilina, 1949). Depuis, une pléthore de structures a été élucidée (**Figure 5**) et la diversité théorique des phénolamides pourrait atteindre plus de 5000 composés. Les phénolamides ont été décrits dans tout le règne végétal et ils s'accumulent dans divers organes, parfois à des concentrations très élevées, notamment dans les tissus blessés (Röpenack et al., 1998; Zácarés et al., 2007; Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012), à la surface des grains de pollen, dans les fleurs et dans les graines (Meurer et al., 1998; Grienberger et al., 2009; Luo et al., 2009; Vogt, 2018).

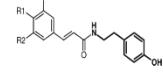
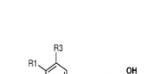
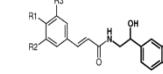
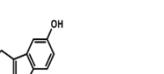
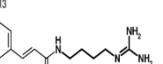
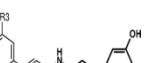
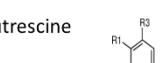
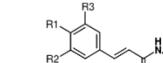
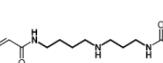
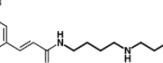
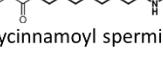
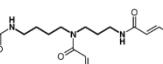
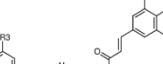
### 1. Biosynthèse et classification

La voie de biosynthèse des phénolamides est un point de rencontre entre la voie des phénylpropanoïdes d'un côté et le métabolisme des amines de l'autre côté (Bassard et al., 2010) (**Figure 5**). L'étape finale de leur synthèse est catalysée par de nombreuses enzymes N-hydroxycinnamoyltransférases, ce qui conduit à l'émergence d'une grande diversité des phénolamides (Bassard et al., 2010; Elejalde-Palmett et al., 2015). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement hydroxycinnamoyl-CoA, vers le groupe amine d'un accepteur (**Figure 5**).



Les N-hydroxycinnamoyltransférases proviennent de l'évolution convergente de deux familles d'acyltransférases distinctes, la famille des acyltransférases BAHD spécifiques des plantes, et des homologues des acyltransférases DAT (transporteur actif de la dopamine) de la famille des GNAT (N-acétyltransférases liées à GCN<sub>5</sub>). La diversité des N-hydroxycinnamoyltransférases en termes d'origine évolutive, de spécificité du substrat et de distribution au sein des espèces conduit à une grande variété de structures et de fonctions des phénolamides. En général, ces dernières sont classées en fonction de leurs propriétés chimiques, c'est-à-dire en tant que phénolamides basiques ou neutres selon leurs groupements amines associés. Ils peuvent être classés, en plus de leur structure chimique, selon l'origine phylogénétique des N-hydroxycinnamoyltransférases impliquées dans leur synthèse. Cette classification se base sur la préférence d'accepteur et la catégorie de groupe amines des N-hydroxycinnamoyltransférases. Elle divise les phénolamides en 5 classes ; les dérivés de tyramine et sérotonine, dérivés de l'agmatine, dérivés de la tryptamine et putrescine, dérivés de la spermidine (synthèse de la spermidine mono et disubstituée), dérivés de la spermidine (synthèse de la spermidine trisubstituée) et les dérivés de l'antranilate (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classification des phénolamides selon l'origine de leurs enzymes. R1=H ou OH, R2 et R3=H, OH, OMe

Classes	Enzymes	Plantes	Phénolamides
Dérivés Tyramine/Sérotonine	CaTHT,StTHT,NtTHT10 /30,NtTHT4/11 SITHT1-3,SITHT7-1 SITHT7-8,CaSHT	Solanaceae	    
Dérivés Agmatine/Tryptamine/Putrescine	AtACT1	Brassicaceae	  
	HvACT,OsAHT1 OsPHT3,OsPHT NaAT1,HvTHT2 HvTHT7,HvTHT8 OsTHT1,OsTHT2 OsTBT1,OsTBT2	Gramineae/ Solanaceae	 
Dérivés Anthranilate	DcHCBT	Carnation	
	AsHHT1,AsHHT4	Oat	
Dérivés Mono-/di spermidine- sibistitué	AtSCT,AtSDT	Rosids	 
	Os12g27220 Os12g27254	Poaceae	
	NaCV86,NaDH29 SmSpmHT, SrSpmHT	Solanaceae	
Dérivés Tri-spermidine- sibistitué	AtSHT,MdSHT NtSHT,SISHT VvSHT,RicSHT RocSHT,SmSHT1 SrSHT1,CiSHT1 CiSHT2	Eudicotylédons	 
	CYP98A8/A9, AtTSM1	Brassicaceae	

## 2. Rôles biologiques des phénolamides

### 2.1. Rôle dans la reproduction

Les études montrant que les phénolamides jouent un rôle dans la reproduction. Ces études reposent sur la corrélation entre l'accumulation de ces composés au moment de l'initiation florale et dans la paroi des grains de pollen. Cependant, aucune preuve directe n'a été fournie jusqu'à présent. Ainsi les dérivés mono/di-putrescine, spermidine et spermine sont supposés être impliqués dans le développement en tant que régulateurs de croissance (Martin-Tanguy, 1997; Edreva et al.,

2007). Ils peuvent aussi jouer un rôle dans la prolifération cellulaire, la formation de cals, la différenciation cellulaire, l'embryogenèse ou l'organogenèse (Edreva et al., 2007).

### **2.1.1. Initiation florale et fertilité**

Chez plusieurs familles de plantes (Solanacées, Brassicacées, Astéracées et les Aracées), les phénolamides s'accumulent à une forte concentration dans les feuilles des méristèmes apicaux et les apex avant l'initiation florale (Cabanne et al., 1981; Martin-Tanguy, 1985 ; 1997). En revanche, les plantes mutantes qui ne fleurissent pas n'accumulent pas de phénolamides (Martin-Tanguy, 1985). Cette accumulation semble aussi être liée à la fertilité des fleurs (Bassard et al., 2010). Ainsi, chez *Brassica juncea*, le niveau d'accumulation des phénolamides est plus faible chez les plantes mâles stériles que chez les plantes témoins (Guo et al., 2003). Une étude plus détaillée sur le soja, montre que les phénolamides interviennent pendant le développement des fleurs, en piégeant les radicaux libres (ROS) pour éviter l'avortement du pollen (Ding et al., 2019).

### **2.1.2. Constituants de la paroi de grains de pollen**

Chez la plupart des espèces, la paroi des grains de pollen matures est formée de trois couches ; une couche interne (intine), une couche externe (exine) (Hess, 1993; Ariizumi and Toriyama, 2011) et une couche supplémentaire appelée couche de pollen ou trypfine. Cette dernière couche constitue la partie la plus externe et joue un rôle dans des multiples mécanismes tels que la reconnaissance de la stigmatisation du pollen, l'auto-incompatibilité, la protection contre les stress abiotiques et biotiques, l'hydratation du pollen... La composition chimique de cette couche de pollen est très variable parmi les espèces, mais une caractéristique commune est l'accumulation de phénolamides (Grienenberger et al., 2009; Quilichini et al., 2015). Les phénolamides accumulés sont des dérivés de polyamines aliphatiques (par exemple spermidines trihydroxycinnamoyl) et leurs amines primaires et secondaires sont acylées (Grienenberger et al., 2009). Ils sont considérés comme marqueurs de l'enveloppe pollinique des eudicotylédones puisqu'ils sont absents de la paroi pollinique des gymnospermes (Elejalde-Palmett et al., 2015). La partie aromatique des phénolamides du grain pollen varie d'une espèce à l'autre. Par exemple, chez *Arabidopsis*, deux principaux phénolamides s'accumulent dans l'enveloppe du pollen, la tri (5-hydroxyféruloyl) spermidine et la di (5-hydroxyféruloyl)-sinapoylspermidine, tandis que dans chez le pommier c'est la tricoumaroyl spermidine et la dicoumaroyl-caféoylspermidine (Grienenberger et al., 2009; Fellenberg, 2013; Elejalde-Palmett et al., 2015). De plus, Delporte et al., (2018) ont montré que les dérivés de spermine entièrement substitués sont les principaux phénolamides accumulés dans la couche pollinique des Astéracées et les considèrent comme des marqueurs du

pollen de cette famille (Delporte et al., 2018). Le rôle précis de l'accumulation de phénolamides sur les grains de pollen n'est pas clairement établi. En effet, l'étude de mutants *Arabidopsis* où les phénolamides sont absents de la couche pollinique n'a montré aucun phénotype clair : bien que la morphologie du pollen soit légèrement modifiée, le grain de pollen est toujours viable et fertile (Grienberger et al., 2009).

En revanche, des expériences réalisées *in vitro* avec des phénolamides extraits à partir de pollen trouvé sur des abeilles ont mis en évidence un rôle potentiel dans la protection contre le stress oxydatif (Zhang et al., 2020b). De plus, des propriétés antifongiques ont été signalées pour les phénolamides accumulés à la surface du pollen de tournesol (Kyselka et al., 2018). D'autres rôles de protection contre les stress abiotiques ou biotiques (résistance à la dessiccation, activité antifongique, interaction des insectes, activité antimicrobienne) sont attribués aux phénolamides du manteau pollinique, en plus des fonctions d'interaction entre stigmate-pollen et la germination de ce dernier (Grienberger et al., 2009; Elejalde-Palmett et al., 2015; Fellenberg and Vogt, 2015; Delporte et al., 2018; Vogt, 2018).

## 2.2. Rôles protecteurs contre les stress biotiques

### 2.2.1. Agents pathogènes

Depuis la première démonstration d'accumulation de *p*-coumaroyl- et de féruloyl-2-hydroxyputrescine dans les feuilles de blé infectées par la rouille (Samborski and Rohringer, 1970), de multiples études sur les Solanacées, les Brassicacées et les Poacées ont confirmé que l'accumulation de phénolamides en réponse à une infection microbienne est une tendance globale (Negrel and Jeandet, 1987; Torrigiani et al., 1997; Roepenack-Lahaye et al., 2003; King and Calhoun, 2005; Zácarés et al., 2007; Muroi et al., 2009; Lopez-Gresa et al., 2016; Royer et al., 2016; Morimoto et al., 2018; Ube et al., 2019, 2017). A l'exception des dérivés de spermine trisubstitués, toutes les classes de phénolamides semblent être impliquées dans ces interactions. Cependant, aucune règle claire n'a été identifiée liant la nature du phénolamide induit à la nature du pathogène ou de l'espèce végétale (Röpenack et al., 1998; Baker et al., 2005; Zácarés et al., 2007; Royer et al., 2016; Novo et al., 2017; Morimoto et al., 2018; Ube et al., 2019). L'accumulation des phénolamides a été prouvée comme un composant efficace de la stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes grâce à l'étude de mutants ou de plantes modifiées impactées dans la biosynthèse du phénolamide. En effet, les plants de pomme de terre dont l'expression des facteurs de transcription *StNAC43*, *StMYB8* et *StWRKY1* est restreinte, accumulent moins de phénolamides et sont plus sensibles à *Phytophthora infestans* (Yogendra et al.,

2015, 2017). Une sensibilité accrue à *Alternaria brassicicola* est également observée chez les mutants d'Arabidopsis *Atact*, qui accumulent peu de *p*-coumaroylagmatine (Muroi et al., 2009). A l'inverse, la surexpression de la Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase (THT) endogène dans la tomate augmente l'accumulation de dérivés de tyramine et d'octopamine et sa résistance à *Pseudomonas syringae* (Campos et al., 2014), tandis que l'expression de l'Agmatine coumaroyl transférase d'Arabidopsis (*AtACT*) chez *Torenia hybrida* (Torénie de Fourrier), une scrophulariacée, la rendant plus résistante à *Botrytis cinerea* (Muroi et al., 2012). Les plants de pommes de terre surexprimant à la fois *AtACT* et le transporteur DETOXIFICATION18 d'Arabidopsis (*AtDTX18*), acquièrent la capacité de synthétiser le *p*-coumaroylagmatine et de l'exporter à la surface des feuilles. L'accumulation accrue de *p*-coumaroylagmatine et de *p*-coumaroyl- et de caféoylputrescine à la surface des feuilles de pomme de terre a réduit la germination des spores de *P. infestans* (Dobritzsch et al., 2016).

Le rôle protecteur des phénolamides contre les microorganismes implique au moins deux processus : l'activité antimicrobienne directe et le renforcement de la paroi cellulaire secondaire. Leur activité antimicrobienne a été démontrée contre les bactéries et les champignons principalement par des essais *in vitro*. Des phénolamides composés de tyramine et de tryptamine présentent une activité d'inhibition de la croissance contre *Xanthomonas sp.* (Newman et al., 2001; Morimoto et al., 2018), alors que la *p*-coumaroylnoradrénaline, la *p*-coumaroyldopamine et la féruloyldopamine sont particulièrement efficaces pour inhiber la croissance de *P. syringae* (Röpenack et al., 1998; Zácarés et al., 2007). Concernant les activités antifongiques, les hordatines (dimères d'hydroxycinnamoylagmatine) inhibent la germination des spores de 6 champignons, dont *Bipolaris sorokiniana* et *Botrytis allii*, à de faibles concentrations (aussi faibles que  $10^{-5}$  M) (Stoessl and Unwin, 1970). Chez l'orge, deux dérivés d'agmatine les murinamides A et B, ont été récemment caractérisés pour leur capacité à inhiber la germination des spores et l'elongation du tube germinatif de *B. sorokiniana*, *Fusarium graminearum* et *A. brassicicola* (Ube et al., 2017). Un effet antifongique affectant à la fois la germination des spores et l'elongation des hyphes a également été démontré pour la *p*-coumaroylagmatine sur *A. brassicicola* (Muroi et al., 2009). Plus récemment, plusieurs phénolamides issus de la tryptamine, de la sérotonine et de la tyramine ont été décrits comme inhibiteur de la germination conidienne du champignon pathogène *Cochliobolus miyabeanus* (Morimoto et al., 2018). Les phénolamides contribuent également à renforcer la paroi cellulaire secondaire lors d'une infection pathogène, communément appelée subérisation. En effet, l'implication de phénolamides associés à la tyramine dans le processus de subérisation a été

démontrée par un ensemble d'études combinant le marquage au  $^{14}\text{C}$  et le fractionnement cellulaire de la sous-structure sur des feuilles de pomme de terre blessées ou infectées par des champignons et sur des cultures cellulaires (Negrel and Jeandet, 1987; Schmidt et al., 1998). L'intégration de phénolamides dans la paroi cellulaire a également été démontrée chez l'orge infectée par des champignons (*p*-coumaroylhydroxyagmatine), chez l'avoine stimulée par la chitine (avenanthramide), chez le tabac infecté par un virus (feruloylputrescine et feruloyltryptamine) et chez la pomme de terre infectée par des champignons (Torrigiani et al., 1997; Yogendra and Kushalappa, 2016). L'incorporation à la paroi cellulaire secondaire apparaît comme un processus en plusieurs étapes impliquant une dimérisation ou une polymérisation des phénolamides, ce qui pourrait nécessiter une activité peroxydase, suivie de l'intégration à la paroi cellulaire (King and Calhoun, 2005). La conséquence de l'incorporation des phénolamides à la paroi cellulaire est la réduction de sa digestibilité par les enzymes hydrolytiques des pathogènes et empêche la prolifération de ces derniers.

### 2.2.2. Insectes

L'accumulation de phénolamides en réponse aux insectes a déjà été signalée chez une diversité de plantes, notamment les Solanacées et les Poacées (Pearce et al., 1998; Alamgir et al., 2016). Une telle accumulation peut être induite par différentes types d'herbivorie, y compris les insectes masticateurs et suceurs (Kaur et al., 2010; Alamgir et al., 2016). Parmi les phénolamides accumulés, les dérivés de putrescine et de spermidine sont les plus courants. L'accumulation de dérivés de la tyramine a également été observée dans le maïs infesté par les larves de *Spodoptera littoralis* (Marti et al., 2013).

L'implication des phénolamides dans la défense des plantes contre les insectes est démontrée par plusieurs études. Chez *Nicotiana attenuata*, la désactivation du facteur de transcription *NaMYB8* a conduit à une diminution de l'accumulation de caféoylputrescine et de dicaffeoylspermidine dans les plantes sur lesquelles les chenilles spécialisées et généralistes (*Manduca sexta* et *S. littoralis*, respectivement) se sont bien développées (Kaur et al., 2010). De plus, la pulvérisation de caféoylputrescine sur les feuilles de mutants *NaMYB8* réduit le gain de masse de la larve de *M. sexta* (Kaur et al., 2010). Enfin, l'ajout de phénolamides au régime alimentaire de *Nilaparvata lugens* et de *Sogatella furcifera* augmente leur mortalité (Alamgir et al., 2016). Les phénolamides peuvent également agir comme facteurs de diminution de la ponte des insectes. Les tissus de poivron contenant de la caféoylputrescine provoquent une perturbation de l'oviposition de *Liriomyza trifolii*, et le traitement des cotylédons avec de la *p*-

coumaroylputrescine synthétique diminue également le taux d'oviposition (Tebayashi et al., 2007). Néanmoins, l'induction de l'accumulation des phénolamides lors de l'herbivorie n'est pas toujours liée à une meilleure protection des plantes. Chez le riz, l'accumulation de *p*-coumaroyl- et de féruloylputrescine semble n'avoir aucun impact sur les performances des insectes masticateurs *Spodoptera mauritia* et *Parnara guttata* (Alamgir et al., 2016). De plus, chez le maïs, l'accumulation induite de *p*-coumaroyltyramine en réponse à l'herbivore *S. littoralis* semble être bénéfique pour le développement des larves (Marti et al., 2013). Chez *N. attenuata*, l'accumulation d'un mélange de phénolamides lors d'attaque suggère qu'une diversité de phénolamides est nécessaires pour maximiser l'efficacité de la défense (Onkokesung et al., 2012).

### **2.3.Rôle protecteur contre les stress abiotiques**

Les études sur les phénolamides liés aux stress abiotiques sont plus rares et moins détaillées que celles liées aux stress biotiques. Une accumulation de phénolamides a été signalée dans plusieurs plantes en réponse à une large gamme de stress abiotiques. Les carences minérales (K, Ca, Mg, P, S et Cu), les températures élevées, l'excès d'eau, l'exposition aux UV-B et à des concentrations élevées en ozone ( $O_3$ ) ont induit une accumulation de putrescine et de dérivés de spermidine dans le blé ainsi que dans le tabac et dans les cultures cellulaires du tabac (Klapheck, 1983; Edreva et al., 1995, 1998; Königshofer and Lechner, 2002; Demkura et al., 2010). Les blessures ont induit l'accumulation de dérivés de tyramine, d'octopamine et de putrescine dans les plants de pommes de terre et de tomates (Negrel et al., 1996; Pearce et al., 1998; Matsuda et al., 2005).

Quelques études ont démontré un impact négatif des facteurs abiotiques sur l'accumulation de phénolamides. C'est le cas du stress salin et d'une limitation de la nutrition azotée (Shevyakova et al., 2006; Larbat et al., 2014). Dans ce dernier cas, il est largement démontré qu'une limitation de la nutrition azotée de la plante favorise une augmentation des concentrations en composés phénoliques qui constituent l'un des précurseur des phénolamides(Larbat et al., 2014; Royer et al., 2016). On peut donc supposer que la diminution de concentration en phénolamides des tissus limités en azote pourrait être la conséquence d'une régulation négative des acyltransférases impliquées dans leur synthèse ou d'une diminution de la concentration en polyamines.

Récemment, l'impact des perturbations à long terme des facteurs abiotiques impliqués dans les changements climatiques (élévation des concentrations atmosphériques de  $CO_2$  et d' $O_3$ , et de la température) a été évalué sur les métabolites induits des feuilles d'orge. Les plantes cultivées dans des conditions de température élevée (+ 5 ° C) ont accumulé plus d'hordatine dans les feuilles non

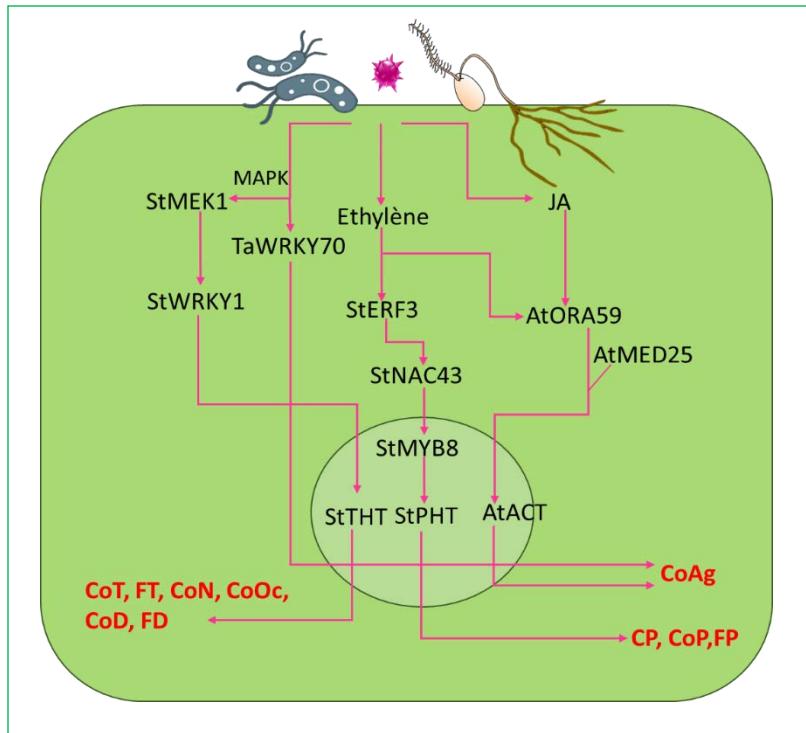
infectées, mais aussi plus de dérivés d'agmatine après une infection par un pathogène. L'impact des facteurs abiotiques était très spécifique aux phénolamides (Mikkelsen et al., 2015).

Le rôle exact de l'accumulation de phénolamides sur l'adaptation de la plante aux stress abiotiques reste encore très hypothétique. Une première hypothèse est que les phénolamides contribuent à limiter le stress oxydatif médié par les différentes contraintes abiotiques. Les phénolamides sont des anti-radicaux libres et des antioxydants efficaces (Langebartels et al., 1991; Edreva et al., 1998; Choi et al., 2007; Georgiev et al., 2012; Abe et al., 2017). Par ailleurs, il semble que ces molécules puissent également être impliquées dans la protection des plantes contre les UV solaires.

### 3. Régulation de la synthèse des phénolamides dans les plantes

Les mécanismes de régulation de synthèse et d'accumulation de phénolamides en réponse à un stress biotique ont été mis en évidence récemment (**Figure 6**). Concernant l'infection microbienne, une première étude sur la réponse de défense de la tomate à *P. syringae*, a démontré, par l'utilisation de mutants de signalisation et d'inhibiteurs de phytohormone, que l'accumulation de phénolamides était dépendante de l'éthylène (ET) mais pas de l'acide salicylique (SA) (Zacarés et al., 2007). La voie de l'éthylène est également impliquée, avec la voie du jasmonate (JA), dans l'accumulation de phénolamides induites par les champignons nécrotropes *A. brassicicola* et *B. cinerea* chez *A. thaliana* (Muroi et al., 2009; Li et al., 2018d). En effet, les deux phytohormones induisent, en synergie, l'expression d'*AtACT* (**Figure 6**). Cette induction est médiée par le facteur de transcription *AtORA59* qui, conformé en homodimère et associé au régulateur MEDIATOR 25, peut se lier au promoteur *AtACT* et induire son expression (Li et al., 2018d). L'induction de *AtACT* est également associée à l'expression de *DTX18*, un transporteur d'extrusion de médicaments et de toxines multiples (MATE) initialement trouvé pour exporter la *p*-coumaroylagmatine à la surface des feuilles d'*Arabidopsis* lorsqu'il est attaqué par le champignon *P. infestans*, l'agent du mildiou de la pomme de terre (Dobritsch et al., 2016). Une analyse exhaustive de la réponse de défense de la pomme de terre chez les cultivars résistants et sensibles infestés de *P. infestans* a conduit à l'identification d'au moins deux voies complémentaires régulant l'accumulation de phénolamides qui se produisent dans les cultivars résistants (Yogendra et al., 2015, 2017). Une première voie est initiée par l'ET. Elle implique une cascade de régulation du facteur de transcription comprenant *StERF3*, qui active la transcription de *StNAC43* qui, à son tour, active l'expression de *StMYB8* (**Figure 6**). *StMYB8* est un facteur de transcription régulant positivement l'expression d'un sous-ensemble de gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïde. Parmi elles, l'hydroxycinnamoyl-

CoA: shikimate / quinate hydroxycinnamoyl transférase (HCT) et Putrescine N-hydroxycinnamoyl transférase (PHT) sont liées au métabolisme des phénolamides et d'autres sont liées à l'accumulation de flavonoïdes. La désactivation de *StNAC43* ou de *StMYB8* nuit à l'accumulation de phénolamides et de flavonoïdes et réduit la résistance de la pomme de terre à *P. infestans* (Yogendra et al., 2017). Une deuxième voie implique le facteur de transcription *StWRKY1* (**Figure 6**). L'activité *StWRKY1* pourrait être régulée au niveau de la transcription, puisque des sites de liaison à la protéine de choc thermique (HSP) ont été trouvés dans son promoteur, ou au niveau de la protéine par phosphorylation par *StMEK1*, une MAP kinase, qui pourrait permettre la migration de *StWRKY1* dans le noyau (Yogendra et al., 2015). Il est intéressant de noter que les deux voies de régulation mises en évidence chez la pomme de terre semblent contrôler différents sous-ensembles de phénolamides, le premier étant plus spécialisé des dérivés de putrescine et d'agmatine, le seconde impliquant des dérivés de tyramine et d'octopamine (Yogendra et al., 2015, 2017). Dans le blé, un autre facteur de transcription WRKY, *TaWRKY70*, est impliqué dans l'accumulation de *p*-coumaroylagmatine et de *p*-coumaroylputrescine en réponse à une infection par *F. graminearum* (Kage et al., 2017).



**Figure 6 :** Mécanisme de régulation de l'accumulation des phénolamides dans les cellules végétales suite à l'infection par des pathogènes. L'infection induit les voies de l'éthylène et de l'acide jasmonique (JA). L'éthylène et l'acide jasmonique induisent le facteur de transcription AtORA59. AtORA59, lié à son régulateur AtMED25, va se lier au promoteur du gène AtACT et induire son expression. L'induction de ce gène est accompagnée par l'accumulation de la *p*-coumaroylagmatine (CoAg) vers les surfaces des feuilles. L'éthylène induit aussi le facteur de transcriptions StERF3, qui à son tour permet l'induction successive des facteurs de transcription StNAC43 et StMYB8. Le facteur StMYB8 régule à son tour l'expression du gène StPHT et conduit à l'accumulation de la cafféoylputrescine (CP), la *p*-coumaroylputrescine (CoP) et la feruloylputrescine (FP). En plus de ces deux voies, une voie MAP kinase contrôle l'accumulation de certains phénolamides. Elle implique la protéine StMEK1 et les facteurs de transcription StWRKY1 et TaWRKY70. StWRKY1 se déplace vers le noyau et permet l'activation d'une tyramine transférase (StTHT) et l'accumulation des phénolamides *p*-coumaroyltyramine (CoT), feruloylturamine (FT), *p*-coumaroylnoradrenaline (CoN), *p*-coumaroyloctopamine (CoOc), *p*-coumaroyldopamine (CoD), et la feruloyldopamine (FD). TaWRKY70 induit l'accumulation de la CoAg et la CoP.

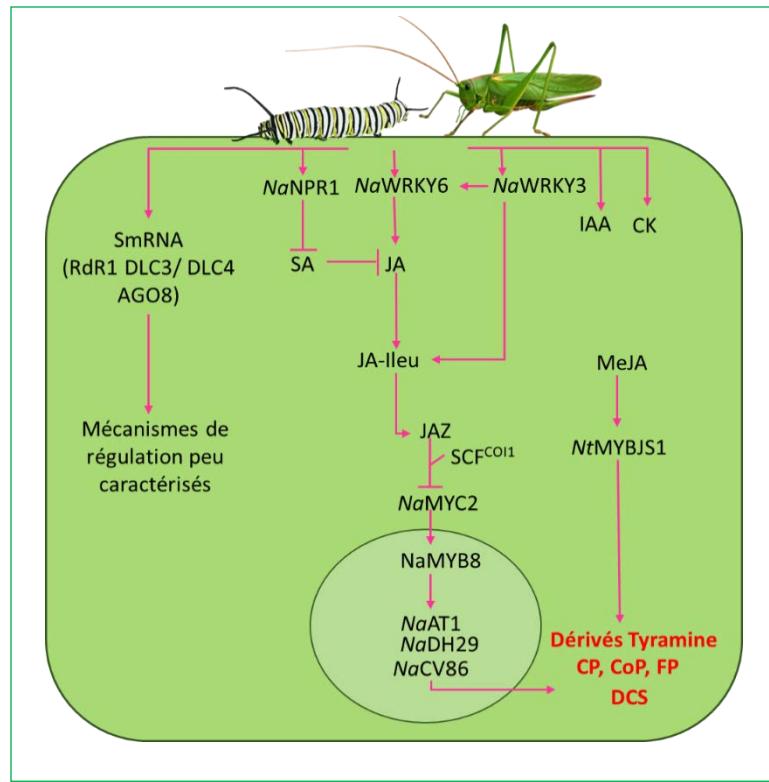
Les mécanismes régulant l'accumulation de caféoylputrescine et des mono et dicaffeoylspermidines en réponse à l'herbivorie ont été largement étudiés sur le modèle *N. attenuata*. L'accumulation de phénolamides constitue, avec les accumulations de nicotine et d'inhibiteurs de protéase, la principale réponse de cette plante aux attaques d'herbivores (Grauer et al., 2014). De nombreuses études impliquant des mutants et des transformants altérés dans la biosynthèse et la signalisation du jasmonate, ont clairement montré que l'accumulation de phénolamides induite par les herbivores est médiée par la voie JA. Les principales étapes de cette voie sont identifiées (Halitschke and Baldwin, 2003; Paschold et al., 2007; Stitz et al., 2011) (Figure 7). En aval de la voie JA, le facteur de transcription *NaMYB8* apparaît comme un régulateur central contrôlant positivement le niveau d'expression des gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes (PAL, C4H) et des gènes codant pour les transférases (*NaAT1*, *NaDH29*,

*NaCV86*) qui catalysent les dernières étapes menant à la caféoylputrescine et la dicaféoylspermidine (Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012). Cette réponse à l'herbivorie, médiée par JA, peut être modulée par un grand nombre de processus dont l'interaction des différentes voies de phytohormones. L'herbivorie induit ainsi l'augmentation de plusieurs phytohormones comme la SA et la cytokinine (CYT) en plus de la JA (Figure 7). SA et JA sont des phytohormones antagonistes bien connues favorisant la réponse de défense aux pathogènes et aux herbivores, respectivement. En réponse aux herbivores, l'impact antagoniste de SA sur JA peut être inhibé par des protéines régulatrices, notamment NPR1 (Rayapuram and Baldwin, 2007). La CYT apparaît comme un régulateur positif de la réponse aux herbivores JA-dépendante puisque les plantes *N. attenuata* affectées au niveau de la perception de la cytokinine, ont une accumulation plus faible de phénolamides en réponse aux herbivores (Schäfer et al., 2015). La CYT mais aussi l'acide auxine indole acétique (IAA) sont importants pour l'accumulation constitutive de phénolamides en réponse aux herbivores, alors que l'éthylène semble moduler à la baisse l'accumulation de phénolamides induits localement (Schäfer et al., 2015). Dans le riz, l'homologue de l'auxine, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) stimule la réponse JA-dépendante aux herbivores (Xin et al., 2012).

L'accumulation de phénolamides en réponse aux herbivores est également modulée par de petits ARN. Dans le cas de *N. attenuata*, la machinerie des petits ARN implique les protéines ARN polymérase 1 dirigée par l'ARN (RdR1), les DCL3 et DCL4 de type Dicer et l'Argonaute 8 (AGO8) (Pandey and Baldwin, 2007; Bozorov et al., 2012; Pradhan et al., 2017). Les mécanismes par lesquels ce complexe module l'accumulation de phénolamides induits par les herbivores ne sont pas encore clairs. La réponse induite par les herbivores est également modulée par des stress abiotiques tels que les UV-B qui stimulent également la voie du JA (Demkura et al., 2010).

Derrière les connaissances approfondies acquises sur la plante modèle *N. attenuata*, les connaissances des mécanismes de régulation des phénolamides induits par les herbivores sont beaucoup plus limitées. Dans les cultures cellulaires de *N. tabacum*, l'accumulation de phénolamides en réponse au traitement au méthyl-jasmonate (MeJA) est médiée par le facteur de transcription *NtMYBJS1*, un orthologue proche de *NaMYB8* (Gális et al., 2006) (Figure 7). L'accumulation de caféoylputrescine dans les plants de poivron peut être induite par pulvérisation de MeJA sur les feuilles (Tebayashi et al., 2007) et l'accumulation de phénolamides est altérée chez les mutants de tomate *jai1* affectés au niveau de la perception de JA (Chen et al., 2006), indiquant l'implication de la voie du JA dans l'accumulation de phénolamides induite par les herbivores dans

ces plantes. Chez le riz, l'ajout de JA au milieu de culture des semis a induit l'accumulation d'une grande diversité de phénolamides (Morimoto et al., 2018). Cependant, le mutant *Osjar1* qui présente un déficit en JA-Ileu (ou jasmonyl- isoleucile ; la forme active de l'acide jasmonique) n'est que partiellement affecté pour l'accumulation de phénolamides induite par les herbivores, suggérant une voie de régulation alternative (Tanabe et al., 2016). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour élucider les étapes de régulation impliquées dans les diverses familles de plantes induisant la synthèse de phénolamides en réponse aux herbivores.



**Figure 7 :** Régulation des phénolamides par l'herbivorie. L'herbivorie induit l'accumulation de l'acide jasmonique (JA) converti en sa forme 7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine (JA-Ileu). JA-Ileu s'associe au complexe  $SCF^{COII}$  pour dégrader le suppresseur JAZ, ainsi le facteur de transcription NaMYC2 est libéré. NaMYC2 active le facteur de transcription NaMYB8 et ce dernier contrôle positivement l'expression des gènes codant pour des enzymes N-transférases (NaAT1, NaDH29, NaCV86) qui à leur tour catalysent les dernières étapes de la synthèse de la caffeoylputrescine (CP) et la dicaffeoyl spermidine (DCS). La machinerie SmRNA est également induite par l'herbivorie et elle implique la protéine RNA polymérase (RdRI), les protéines de type Dicer (DLC3 et DLC4) et la protéine Argonaute 8 (AGO8). L'herbivorie induit l'expression des facteurs de transcription appartenant à la famille WRKY (NaWRKY6, NaWRKY3) qui vont induire l'accumulation du JA et du JA-Ileu. Le méthyl jasmonate (MeJA) induit l'activation du facteur de transcription NtMYBJS1 et l'accumulation de la caffeoylputrescine. D'autres phytohormones sont induites par l'herbivorie : acide salicylique (SA), auxine (IAA) et la cytokinine (CK). En jaune les phénolamides induits par l'herbivorie. CoP: p-coumaroylputrescine, FP: feruloylputrescine. NaNPR1: protéine régulatrice qui permet d'enlever l'effet antagoniste du SA sur la JA.

## C- Le modèle tomate

### 1.La tomate, une culture mondiale de première importance

La tomate (*Solanum lycopersicum*), plante dicotylédone herbacée, appartient à la famille des Solanacées. Elle est originaire du Nord-Ouest de l'Amérique du Sud et elle est considérée comme une source alimentaire importante pour l'homme (Friedman, 2002). C'est l'un des végétaux les plus consommés à l'échelle mondiale (Van Eck et al., 2006). Elle est au deuxième rang mondial après la culture de pomme de terre, avec environ 182,3 millions de tonnes produites chaque année (FAOSTAT, 2019). La production est majoritairement localisée en Asie (61%), tandis que l'Europe, l'Amérique et l'Afrique représentent respectivement 14%, 13% et 12% de la production mondiale. La Chine est le pays qui consomme le plus de tomates au monde, suivie par l'Inde, l'Afrique du Nord, le Moyen-Orient, les États-Unis et le Brésil (FAOSTAT, 2019). En plus des fruits frais, la tomate est consommée après transformation dans des soupes, des jus et des sauces (Krauss et al., 2006; Li et al., 2018c).

La tomate contient une diversité de métabolites spécialisés intéressants pour la santé, comprenant des vitamines, des caroténoïdes, des composés phénoliques et des glycoalcaloïdes (Raiola et al., 2014; Liu et al., 2016; Li et al., 2018c). Ces métabolites représentent des composés bioactifs à large éventail de propriétés thérapeutiques : effets anti-inflammatoires, anti-allergènes, antimicrobiens, vasodilatateurs, anti thrombotiques, cardio-protecteurs et antioxydants (Raiola et al., 2014). Ces molécules sont aussi d'importants déterminants du goût, de la couleur et de la texture du fruit (Raiola et al., 2014; Martí et al., 2016; Quinet et al., 2019). La tomate est ainsi la principale source de lycopène dans l'alimentation humaine (Viuda-Martos et al., 2014). En plus des caroténoïdes, la tomate contient plus de 500 formes de flavonoïdes (Bovy et al., 2007; Quinet et al., 2019), plus de 100 glycoalcaloïdes dont le plus abondant est la tomatine (Tohge and Fernie, 2015) et plus de 400 composés volatils (Quinet et al., 2019). Il existe plus de 12 espèces de tomate sauvage (Knapp et Peralta 2016), parmi lesquelles *Solanum pimpinellifolium* à fruit rouge qui est considérée comme l'ancêtre et le plus proche parent de la tomate cultivée (Peralta et al., 2008; Zuriaga et al., 2009; Blanca et al., 2015). L'espèce a fait l'objet depuis longtemps d'une sélection pour des caractères souhaitables tels que la taille du fruit, la teneur en sucre et en métabolites spécialisés (lycopène) (Ilahy et al., 2009; Kanayama, 2017). Cette sélection a conduit à réduire la diversité génétique au sein des espèces cultivées, ainsi que la capacité de résister aux stress biotiques et abiotiques (Sim et al., 2010).

## 2. Un modèle majeur pour les études scientifiques

L'espèce tomate présente des caractéristiques d'un très bon modèle d'études dans le domaine de la recherche, telles que le cycle de vie court pour certaines variétés (ex. Microtom), l'autopollinisation, la facilité de croisement, la taille moyenne de son génome (environ 900 Mo), la facilité et l'efficacité de transformation génétique (Van Eck, 2018; Li et al., 2018c; Quinet et al., 2019). En outre, le génome de la tomate est entièrement séquencé à haute qualité (Sato et al., 2012; Lin et al., 2014; Zhu et al., 2018). De plus, un énorme volume de données transcriptomiques et métaboliques est disponible (Tohge and Fernie, 2015; Rothan et al., 2019). Le grand succès des nouvelles technologies de séquençage (QTL-seq, MPS)<sup>1</sup> associé à l'efficacité du système d'édition génétique CRISPR /Cas9 et la création des mutants TILLING<sup>2</sup> chez la tomate, ont fait de cette dernière un modèle d'étude pertinent pour approfondir la compréhension de sa biologie et celle d'autres plantes à fruits charnus (Illa-Berenguer et al., 2015; Garcia et al., 2016; Zhu et al., 2018; Li et al., 2018c; Rothan et al., 2019).

## 3. La culture de tomate est soumise à une forte pression parasitaire

L'espèce tomate est sujette à l'attaque d'une grande diversité de pathogènes (bactéries, virus, champignons) (Lecompte et al., 2017; Moriones et al., 2017; Timilsina et al., 2018) et de ravageurs (nématodes et insectes) qui fait l'objet de nombreuses études (Lamovšek et al., 2017; Vargas-Ortiz et al., 2018; Arnó et al., 2019; (Rivas and Thomas, 2005; Paudel et al., 2019). Les principales maladies des tomates sont causées par 24 champignons, 7 bactéries tel que *Ralstonia solanacearum* et *Clavibacter michiganensis*, 10 virus (*Tomato mosaic virus*, *Cucumber mosaic*, *Tomato yellow leaf curl virus*), 3 viroïdes et plusieurs nématodes (*Meloidogyne javanica*, *M. hapla*, *M. incognita* et *M. arenaria*) (Jones, 1991; Arie et al., 2007). *Alternaria alternata* (Yang et al., 2017), *Botrytis cinerea* (Smith et al., 2014), *Fulvia fulva* (Griffiths et al., 2018), *Fusarium oxysporum* (Srinivas et al., 2019), *Phytophthora infestans* (Rodenburg et al., 2019) représentent les principaux champignons pathogènes des tomates.

Plusieurs études se sont focalisées sur l'identification et la caractérisation des différents gènes et molécules jouant un rôle dans la défense des plants de tomates (Jahn et al., 2000; Cooper

---

<sup>1</sup> QTL-seq (quantitative trait locus sequencing) (Jamann et al., 2015) et MPS (massively parallel sequencing) ou NGS (next generation sequencing) (Aly and Sabri, 2015).

<sup>2</sup>TILLING : Targeting Induced Local Lesions in Genomes, méthode de biologie moléculaire utilisée identifier à haut débit les mutations ponctuelles suite à une mutagenèse génétique (Kurowska et al., 2011; Till et al., 2018)

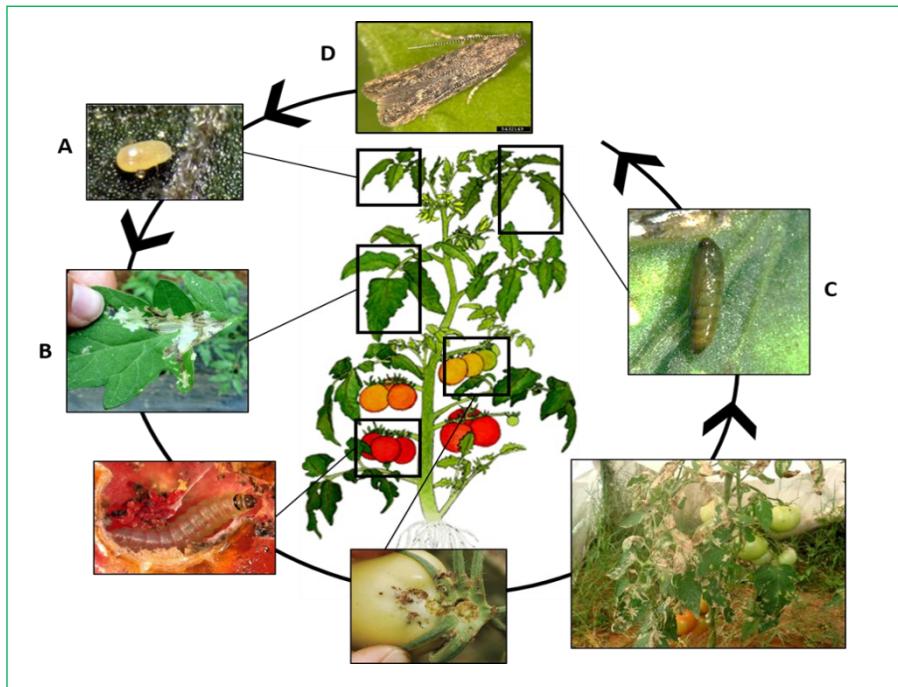
et al., 2004; Adhikari et al., 2017; Quesada-Ocampo and Hausbeck, 2010; Nazar et al., 2018; Coppola et al., 2018; El-Sappah et al., 2019). Elles ont permis de (i) décrypter les voies de signalisation mobilisées dans la réponse de la plante, comme les voies de l'acide jasmonique, des octadécanoïdes et de l'éthylène (Ciardi et al., 2000; Díaz et al., 2002; Li et al., 2002; Ament et al., 2004), et (ii) d'identifier des gènes codant pour des protéines et des peptides impliquées dans la mise en place des défenses tels que des cytochromes P450 (Howe et al., 2000), des inhibiteurs de protéinase (Kant et al., 2004), des polyphénol oxidases, des peroxydases (POD), des chitinases, et callose synthase (Stout et al., 1994; Walling, 2000) qui sont induites en cas d'herbivorie par différents types d'insectes et de larves (*Chrysoperla*, *Liriomyza spp*, *Tuta absoluta*, *Heliothis armigera*, *Chrysodeixis chalcites*, *Aculops lycopersici*, *Tetranychus evans*, *Tetranychus urticae*, *Bemisia tabaci*...). Plusieurs variétés résistantes ont été créées et des pratiques culturales améliorées (utilisation des substances organiques, des biofertilisants, teneur en azote de la solution de culture hydroponique) en vue de lutter contre ces agresseurs (Hosseini et al., 2015; Mohamadi et al., 2017).

#### 4. *Tuta absoluta*, un ravageur spécialiste des Solanacées

Le modèle auquel je m'intéresse dans ma thèse est le modèle tomate/*Tuta absoluta*. *T. absoluta* (Meyrick) est un petit lépidoptère de la famille des Gelechiidae. Il représente la menace la plus forte pour les cultures de tomate car il provoque des pertes de rendement drastiques par ses larves mineuses qui se nourrissent du mésophile des feuilles (Desneux et al., 2010) (**Figure 8**). Originaire de l'Amérique du Sud, il a envahi l'Europe et l'Afrique du Nord en 2006. Depuis 2012, son aire s'est élargie à l'Afrique et l'Asie (Biondi et al., 2018). Les dégâts causés par ses larves mineuses peuvent aller jusqu'à 100% de perte en l'absence de méthodes de gestion (Desneux et al., 2011).

La durée de son cycle de vie varie de 26 (à 34,6 °C) à 75 jours (à 14°C), avec une température optimale de 30°C (Martins et al., 2016). Son cycle est composé de 4 stades de développement représentés dans la **figure 8**: la première étapes est celle des œufs jaunes pondus par les femelles sur les jeunes feuilles les tiges ou les sépales (**A**), larves qui se nourrissent des feuilles en y creusant des galeries (**B**), pupes (**C**) puis adultes (**D**) (Cocco et al., 2015; Biondi et al., 2018) (**Figure 8**). Les femelles peuvent pondre environ 260 œufs au cours de leur vie (Uchoa-Fernandes et al., 1995). Elles se reproduisent par accouplement mais la parthénogénèse a également été démontrée dans certains cas (Caparros Megido et al., 2012; Abbes and Chermiti, 2014). *T. absoluta* peut tolérer les basses températures avec un taux de survie de 50% à 0°C (Cuthbertson et

al., 2013). Cela signifie que *T. absoluta* peut avoir jusqu'à 10 générations par an et survivre pendant les saisons froides dans des cultures protégées et en plein champ (Biondi et al., 2018).



**Figure 8 :** Le pathosystème Tomate/*T. absoluta*. Le cycle de vie de *T. absoluta* est composé de 4 étapes. A : La femelle pose ses œufs sur les jeunes feuilles du plant tomate. B : Les œufs se développent en jeunes larves affamées qui se nourrissent sur le parenchyme des feuilles. Il existe 4 stades larvaires. A forte densité, les larves attaquent les fruits et les sépales. Cette étape du cycle est la plus longue et se caractérise par des énormes dégâts sur les cultures. C : Les larves forment des pupes qui génèrent des adultes (D).

## 5. Quelles solutions pour le contrôle de *T. absoluta* ?

### 5.1. Diverses solutions contre *T. absoluta*

Plusieurs techniques de lutte sont utilisées contre ce ravageur tels que, les pièges distributeurs de phéromones en association avec des sources lumineuses, les pièges à eau, les pièges collants (Caparros Megido et al., 2012; Biondi et al., 2018). Puisque la femelle est capable de parthénogénèse ou d'accouplements multiples, la meilleure solution est d'empêcher la migration des femelles fécondées dans les serres de cultures (Caparros Megido et al., 2012; Lee et al., 2014; Biondi et al., 2018). De nombreuses espèces d'insectes sont considérées comme des ennemis naturels de *T. absoluta* (les anthocoridés, les géocoridés, les mirides, les nabidés et les pentatomides) et peuvent ainsi être utilisés dans la lutte biologique de ce ravageur (Desneux et al., 2010; Zappalà et al., 2013).

## 5.2.Lutte chimique, biopesticides

Un autre moyen de lutte est l'utilisation d'insecticides de synthèse comme le chlorfénapyr pyrrole, les diamides chlorantraniliprole et flubendiamide, ou biopesticides comme les spinosines (Silva et al., 2011; Guedes and Picanço, 2012; Gontijo et al., 2013). L'utilisation d'insecticides n'est évidemment pas une solution pérenne car *T. absoluta* a montré des résistances pour certains d'entre eux (Guedes and Picanço, 2012; Salazar and Araya, 2001). De plus, leur utilisation entraîne des conséquences qui peuvent avoir des effets imprévisibles sur l'efficacité de la lutte antiparasitaire et les rendements (Biondi et al., 2018). Les progrès scientifiques se focalisent sur l'utilisation des biopesticides, notamment les huiles essentielles pour la lutte contre *T. absoluta* en agissant sur les larves, tel que l'huile essentielle de l'Ajwain (*Carum copticum*) (Piri et al., 2020), de l'écorce d'agrume (*citrus*) (Campolo et al., 2017), du *Thymus capitatus* et du *Tetraclinis articulata* (Bouayad Alam et al., 2017). Ces deux derniers ont conduit à un taux de mortalité de 80% pour tous les stades larvaires de *T. absoluta* et notamment le premier stade (avec une mortalité de 100% après 1,5 h d'exposition) (Bouayad Alam et al., 2017). D'autres huiles essentielles jouent un rôle important dans la perturbation de l'oviposition et la répulsion des adultes tel que l'huile essentielle de basilic (Yarou et al., 2018), huile *d'Ocimum gratissimum* et *d'Ocimum kilimandscharicum* (Essoung et al., 2020).

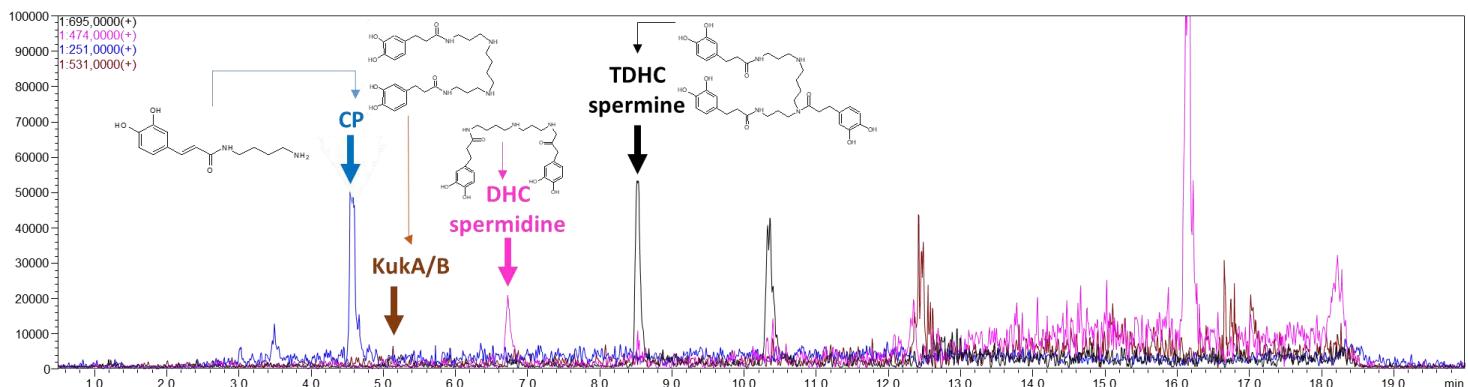
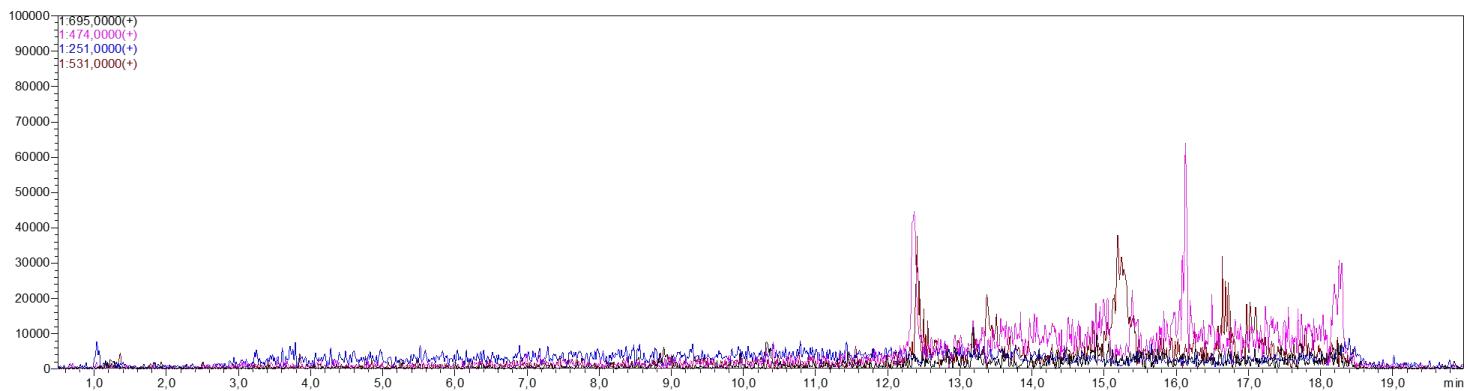
## 5.3.A la recherche des traits de résistance dans des espèces sauvages

Bien que la tomate sauvage présente des traits génétiques de résistance à *T. absoluta*, la tomate cultivée est en revanche très vulnérable à ce ravageur (Gharekhani and Salek-Ebrahimi, 2014; Sohrabi et al., 2016). Chez les tomates sauvages, la résistance constitutive est liée à l'allélochimie des feuilles par les composés volatils (COV) ou à la densité des trichomes (de Azevedo et al., 2003; Guedes and Picanço, 2012). La résistance constitutive représente le système de défense, qui se trouve à la base dans la plante en état normal (Zhang et al., 2020a). En plus des COV des feuilles, les trichomes glandulaires contiennent du 2-tridécanone, du zingibérène, ou des sucres acylés (de Azevedo et al., 2003; Bleeker et al., 2012; Sohrabi et al., 2016). L'ensemble de ces composés perturbent l'oviposition, altèrent la ponte et contribuent à la toxicité pour les larves suite à l'herbivorie (de Azevedo et al., 2003; Resende et al., 2006; Bleeker et al., 2012). Des lignées à haute teneur en sucres acylés ont été obtenues par sélection (Dias et al., 2013; Leckie et al., 2014).

Un autre type de résistance, la résistance induite, peut s'avérer importante dans la défense des tomates à *T. absoluta*. En effet la résistance induite, est stimulée par un stress et elle conduit à des réponses de défense adaptées au stress (Karban and Myers, 1989). Les travaux menés au

laboratoire avant le début de ma thèse ont montré que l'herbivorie de *T. absoluta* induit plusieurs réponses de la plante qui sont (i) une augmentation de l'activité peroxydase (POD) et polyphénol oxydase (PPO), deux classes d'enzymes convertissant les polyphénols en quinones réactives qui se fixent sur plusieurs cibles cellulaires (lipides, protéines) du ravageur, (ii) l'émission de plusieurs COV et (iii) l'accumulation dans les feuilles de métabolites spécialisés dont une dizaine de phénolamides (Thèse de Victoire Coqueret, 2017). Sur ce dernier point, les travaux de V. Coqueret ont révélé que la nature des phénolamides accumulés est assez atypique dans des tissus végétatifs. Ainsi, les principaux phénolamides accumulés sont des dérivés de spermine et de spermidine associés à des dérivées dihydrocaféiques (N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine, kukoamine A/B, N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl)). On trouve également des phénolmaides plus communs comme des dérivés de putrescine (caféoylputrescine, féruloylputrescine, dihydrocaféoyl putrescine) (**Figure 9**). Parmi ces molécules, N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine est celui qui s'accumule le plus suite à l'herbivorie, passant d'une concentration de 10 µg/g de matière sèche dans les feuilles de plantes saines à 1200 µg/g de matière sèche dans les feuilles des plantes infestées par *T. absoluta*. Ce phénolamide n'était jusqu'alors pas décrit chez la tomate (Thèse de Victoire Coqueret, 2017).

Un travail préliminaire a démontré une mortalité larvaire plus importante des larves de *T. absoluta* se nourrissant de feuilles de tomates préalablement infestées que de feuilles de plants non infestés. Ce constat traduit une efficacité, du moins partielle, des défenses induites chez la plante en réponse à l'herbivorie. Cependant, le rôle et l'efficacité spécifique des différentes réponses induites sont à préciser.

**A****B**

**Figure 9 :** Chromatogramme des phénolamides induits dans les feuilles de plant de tomate infestés par *T. absoluta*.

A : Chromatogramme des plantes infestées. B : Chromatogramme des plantes non infestées. En couleur les pics des phénolamides identifiés. L'ion 251 (+) permet de détecter deux isomères de la caféoylputrescine, l'ion 531 (+) permet de détecter les isomères Kukoamine A et B, l'ion 474 (+) permet de détecter le N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine et l'ion 695 (+) permet de détecter le N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine

#### 5.4. Des pratiques culturales agissent sur la résistance de la plante à *T. absoluta*

En plus des résistances constitutive et induite, la modification des pratiques culturales comme l'apport en fertilisation d'azote (N), la disponibilité en eau et la salinité, ont montré un impact sur la croissance des larves. Ainsi, l'irrigation avec de l'eau à haute salinité n'affecte pas le taux de survie des larves mais diminue la durée du cycle de vie de ces ravageurs, conduisant à un nombre de générations plus important et des dégâts potentiellement plus sévères (Han et al., 2016). Des travaux menés au LAE, en collaboration avec deux unités INRAE (PSH : Plante et Systèmes horticoles d'Avignon et ISA : Institut Sophia Agrobiotech) ont montré qu'une disponibilité en eau et azote limitante pour la croissance des tomates, augmente la mortalité des larves, diminue la masse des pupes et ralentit le temps de développement (Han et al., 2015; Royer et al., 2016;

Coqueret et al., 2017). La composition des feuilles ingérées, avec un ratio C/N très élevé et une faible teneur en eau, impacte le développement larvaire (Thèse de Victoire Coqueret, 2017). De plus, la limitation en azote induit l'accumulation des métabolites spécialisés, notamment les métabolites de défense à base de carbone et d'azote (composés phénoliques, tomatine), mais en revanche diminue l'accumulation des phénolamides (Larbat et al., 2014; Royer et al., 2016; Coqueret et al., 2017). L'impact observé sur les larves pourrait être lié à un effet de toxicité des tissus (en déficit d'azote) qui accumulent plus de composés phénoliques.

## D- Objectifs et stratégies de ma thèse

Comme décrit plus haut, les récents travaux menés au LAE dans la cadre de la thèse de Victoire Coqueret (2013-2017) ont mis en évidence plusieurs types de réponse du jeune plant de tomate soumis à l'herbivorie de *T. absoluta*. Parmi ces réponses, l'accumulation de phénolamides dans les parties aériennes est marquante et amène à plusieurs questions. Bien que l'accumulation de dérivés putrescine et tyramine soit assez courante chez la tomate en réponse à différents stress biotiques, l'accumulation de dérivés spermine et spermidine est beaucoup plus atypique et semble être spécifique à l'herbivorie de *T. absoluta*.

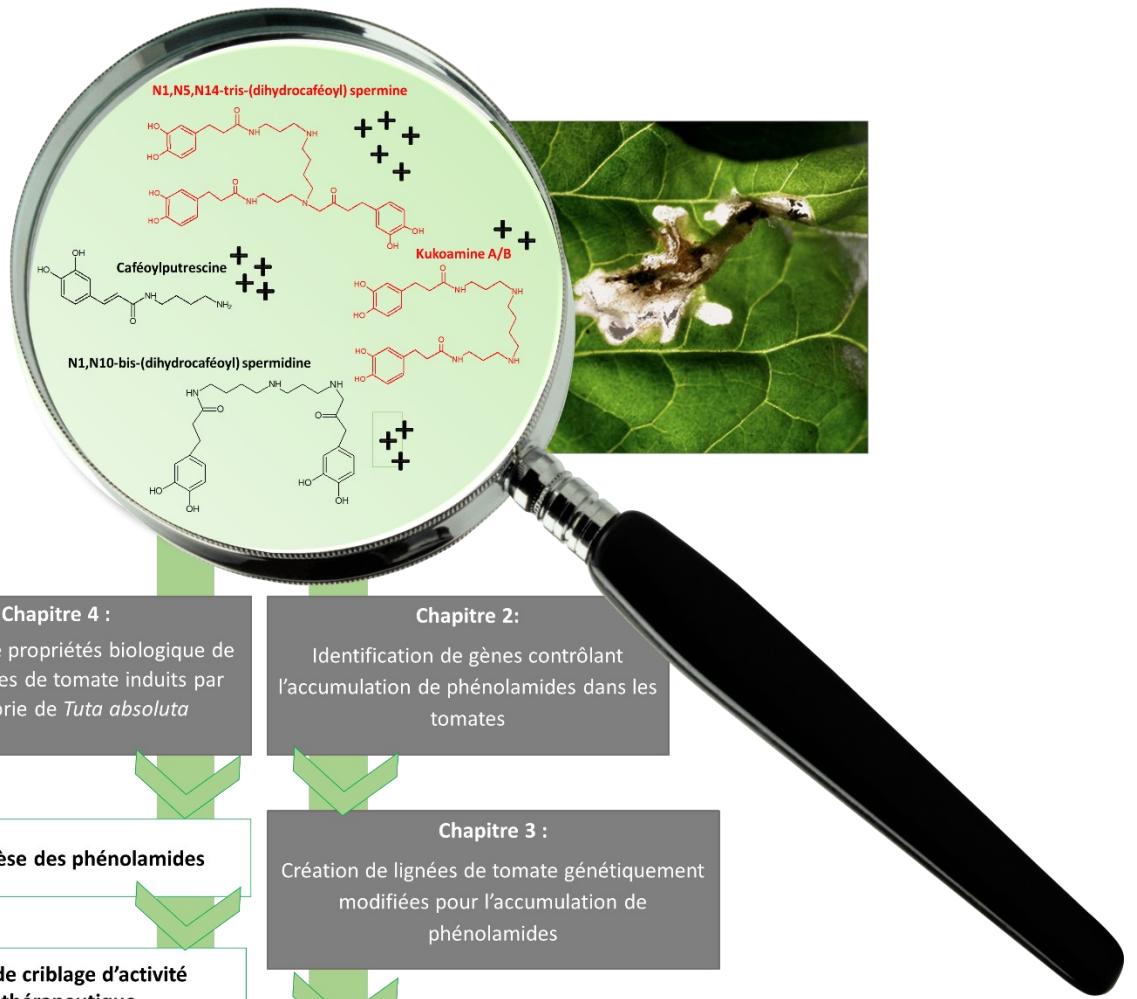
Dans le règne végétal, ces dérivés sont en général plutôt localisés dans les fleurs. En dépit d'une accumulation de phénolamides dans les feuilles, les plantes demeurent sensibles à l'herbivorie de *T. absoluta*. Cependant, le taux de mortalité de larves déposées sur des plantes déjà infestées augmente significativement ce qui laisse supposer que les moyens de défense mis en place par la plante présentent une certaine efficacité. Partant de ce constat, l'impact de l'accumulation de ces phénolamides sur le développement de *T. absoluta* mérite d'être évaluée.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu précédemment, les phénolamides peuvent également être associé à d'autres processus physiologique que la défense. La caféoylputrescine, par exemple s'accumule de manière systémique dans les tiges de la tomate sans pour autant qu'un rôle précis lui soit associé. Enfin, les structures très diverses de cette catégorie de métabolites s'accompagnent d'une diversité de fonctions biologiques à fort enjeux thérapeutiques, comme anti-inflammatoires et anticancéreux (Hadjipavlou-Litina et al., 2009; Wang et al., 2016, 2020). Ainsi, il apparaît pertinent de tester les effets thérapeutiques de ces phénolamides.

Ma thèse s'inscrit dans un des projets de recherche de l'équipe Métabolites Secondaires du Laboratoire, visant à moduler la composition en métabolites secondaires de la plante pour évaluer leur implication dans la physiologie des plantes. Comprendre leurs propriétés biologiques non

seulement dans les plantes mais aussi en vue d'applications en santé humaine fait partie des objectifs de l'équipe. Plusieurs orientations sont possibles pour moduler la composition en métabolites secondaires dont celles consistant à agir sur la disponibilité en ressources de la plante (Royer et al., 2013) ou à modifier génétiquement les plantes. Ma thèse, focalisée sur les interactions entre la tomate et *T. absoluta* effecteurs de synthèse de phénolamides, contribue à ce projet. Elle a pour objectif de moduler la composition en métabolites secondaires dans la plante, ce qui passe par i) l'identification de gènes contrôlant l'accumulation de phénolamides dans la plante (**chapitre 2**) et ii) la création de lignées de tomates génétiquement modifiées (**chapitre 3**). Mes travaux du chapitre 3, contribuent notamment au projet Biotactique, projet collaboratif inter-unité porté par le LAE et financé par le Département AgroEcoSystem de INRAE.

Certains des phénolamides identifiés lors de l'interaction tomate/*T. absoluta* étant structurellement très proches de phénolamides à propriétés thérapeutiques connues, nous avons prospecté leurs propriétés biologiques en tant qu'anti-inflammatoires, antimicrobiens, antixoydants ou anti-cancers (**chapitre 4**). Ces travaux s'inscrivent dans le projet collaboratif « Activités Thérapeutiques de métabolites spécialisés impliqués dans l'Interaction tOmate-*Tuta absoluta* » AnTIdOTe, financé par Lorraine Université d'Excellence. L'objectif général de ma thèse et sa structuration en chapitre sont présentés **Figure 10**.



**Chapitre 4 :**  
Évaluation de propriétés biologique de phénolamides de tomate induits par l'herbivorie de *Tuta absoluta*

**Chapitre 2 :**  
Identification de gènes contrôlant l'accumulation de phénolamides dans les tomates

**Synthèse des phénolamides**

**Test de criblage d'activité thérapeutique**

**Chapitre 3 :**  
Création de lignées de tomate génétiquement modifiées pour l'accumulation de phénolamides

**Moduler la composition des phénolamides dans le plant tomate**

**Evaluer l'effet de la modulation sur la physiologie de la plante**

**Etudes des rôles physiologiques in planta, et les potentiels effets thérapeutiques des phénolamides du plant tomate, induis par *Tuta absoluta***

Figure 10: Structuration de mes travaux de thèse objectif.

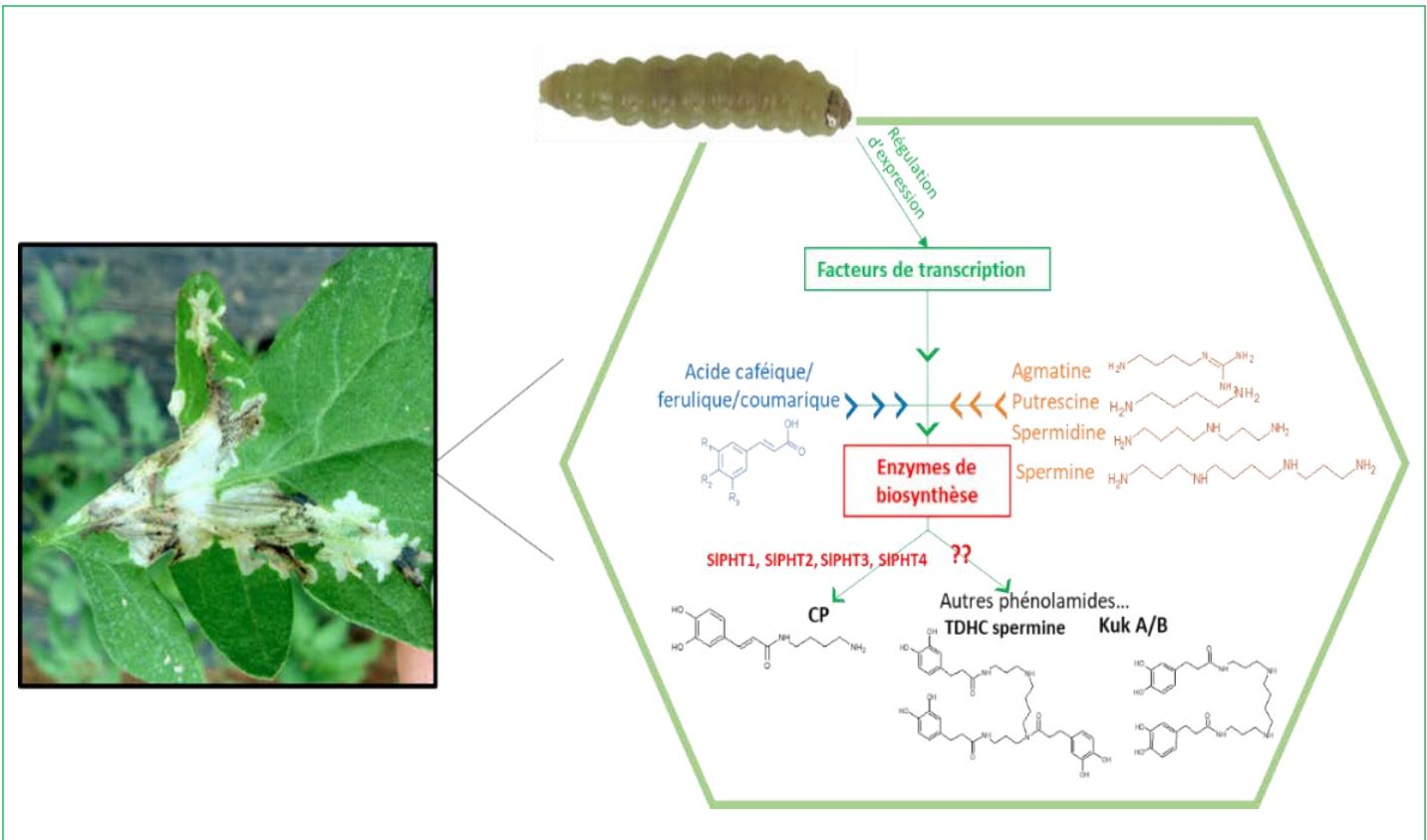
## **Chapitre 2 : Identification de gènes contrôlant l'accumulation de phénolamides dans les tomates**

## 1. Préambule

Dans le but de créer des lignées de tomate dont l'accumulation en phénolamides sera modifiée, un pré-requis est d'identifier les bons gènes à cibler. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, les connaissances sur la voie de biosynthèse des phénolamides et sa régulation ont beaucoup progressé ces dernières années, mais ces progrès concernent essentiellement *N. attenuata*. Chez la tomate, hormis une petite famille multigénique de N-acyltransférases catalysant la synthèse de dérivés tyramine (Röpenack et al., 1998), peu de chose sont encore connues.

Dans ce chapitre je présente les travaux que j'ai conduits afin d'identifier des facteurs de transcription susceptibles de contrôler la voie générale de biosynthèse des phénolamides, ainsi que des gènes codant des N-acyltransférases potentiellement impliquées dans la biosynthèse de dérivés spermine constituant les principaux phénolamides s'accumulant dans les feuilles de tomate soumises à l'herbivorie de *T. absoluta*. Ces travaux avaient pour ambition de compléter des travaux menés au laboratoire et ayant conduit à l'identification de 4 gènes impliqués dans la biosynthèse de caféoylputrescine (Putrescine-hydroxycinnamoyl transférases).

Pour ce travail, je me suis appuyée sur les connaissances acquises chez *N. attenuata* pour identifier des gènes candidats dont j'ai cherché à caractériser la fonction par des approches d'expression transitoire *in planta* et de criblage fonctionnel sur des enzymes purifiées. Un bref rappel des connaissances sur les gènes de régulation et de biosynthèse des phénolamides sera fait en introduction de ce chapitre avant de présenter mes résultats.



**Figure 11 :** La recherche des gènes de biosynthèse. Dans ce chapitre je cherche à trouver des gènes (codants pour des facteurs de transcription et des enzymes) capables de contrôler l'accumulation des phénolamides chez les tomates à différents niveaux de la voie de biosynthèse. En rouge les enzymes de la voie de biosynthèse des phénolamides. CP : cafénylputrescine, TDHC : N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine, KukA/B : kukoamine A/B.

## 2. Introduction

### 2.1. L'accumulation de phénolamides en réponse à l'herbivorie fait intervenir la voie JA et plusieurs facteurs de transcription chez *N. attenuata*.

Ces dix dernières années, les connaissances sur la régulation de l'accumulation des phénolamides suite à un stress biotique ont beaucoup progressé, en particulier chez la plante modèle *N. attenuata*. (Kaur et al., 2010; Chen et al., 2006; Li et al., 2018a). L'herbivorie induit l'accumulation de JA, qui, complexé avec l'isoleucine (Ile) entraîne la dégradation du suppresseur JAZ (jasmonate ZIM domain) en associant ce dernier au complexe SCFcoi1 (Skp1-Cullin-F-box) E3- ubiquitine ligase (Kaur et al., 2010). La dégradation de JAZ entraîne la libération du facteur de transcription *NaMYC2* (Figure 12). L'activation de *NaMYC2* induit l'expression des gènes d'accumulation et de biosynthèse des métabolites de défense chez *N. attenuata* notamment la nicotine, des phénolamides (cafénylputrescine, dicafénylspermidine) (Woldemariam et al., 2013). *NaMYC2* contrôle un autre facteur de transcription, le facteur *NaMYB8* (homologue du *NtMYBJS1* de *Nicotiana tabacum*), qui s'est avéré important pour la régulation spécifique de

l'accumulation des phénolamides (Kaur et al., 2010). *NaMYB8* est fortement accumulé dans les tabacs agressés par *Manduca sexta*. Il induit une forte accumulation de caféoylputrescine (CP) et de dicaféoylspermidine. En outre, les plantes de tabac où le gène *NaMYB8* a été éteint (par la méthode RNA interférence) ont montré une diminution d'accumulation de ces métabolites et une vulnérabilité à l'insecte (Kaur et al., 2010). Dans leurs études, Onkokesung et al. (2012) ont montré que *NaMYB8* contrôle une grande diversité de phénolamides dérivés de putrescine et spermidine (par exemple coumaroylputrescine, feruloylspermidine), en plus de la CP et la dicaféoylspermidine.

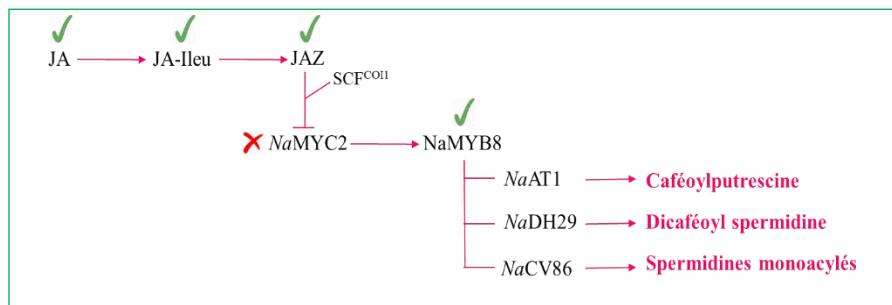


Figure 12 : Mécanisme de régulation de l'accumulation de la caféoylputrescine et autres phénolamides chez *N. attenuata*.

## 2.2.N-hydroxycinnamoyl-transférases et diversité des phénolamides

La dernière étape de biosynthèse des phénolamides est catalysée par des enzymes N-hydroxycinnamoyl transférases qui permettent de relier les esters CoA des acides phénoliques (coumaroyl-CoA, feruloyl-CoA, caféoyl-CoA, benzoyl-CoA..) à des polyamines (agmatine, spermine, spermidine, putrescine, tyramine, dopamine..) ou à des anthranilates (Bassard et al., 2010; Petersen, 2016) (Figure 13).

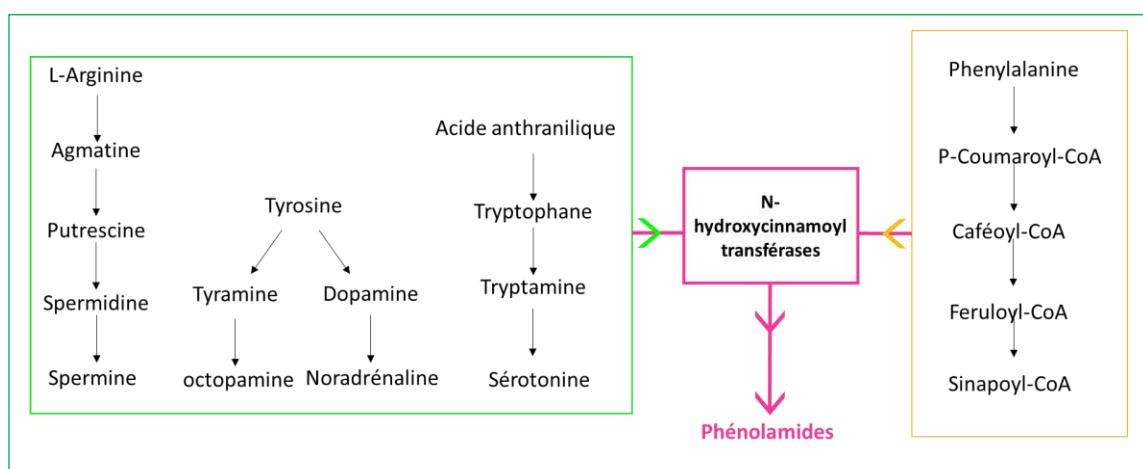
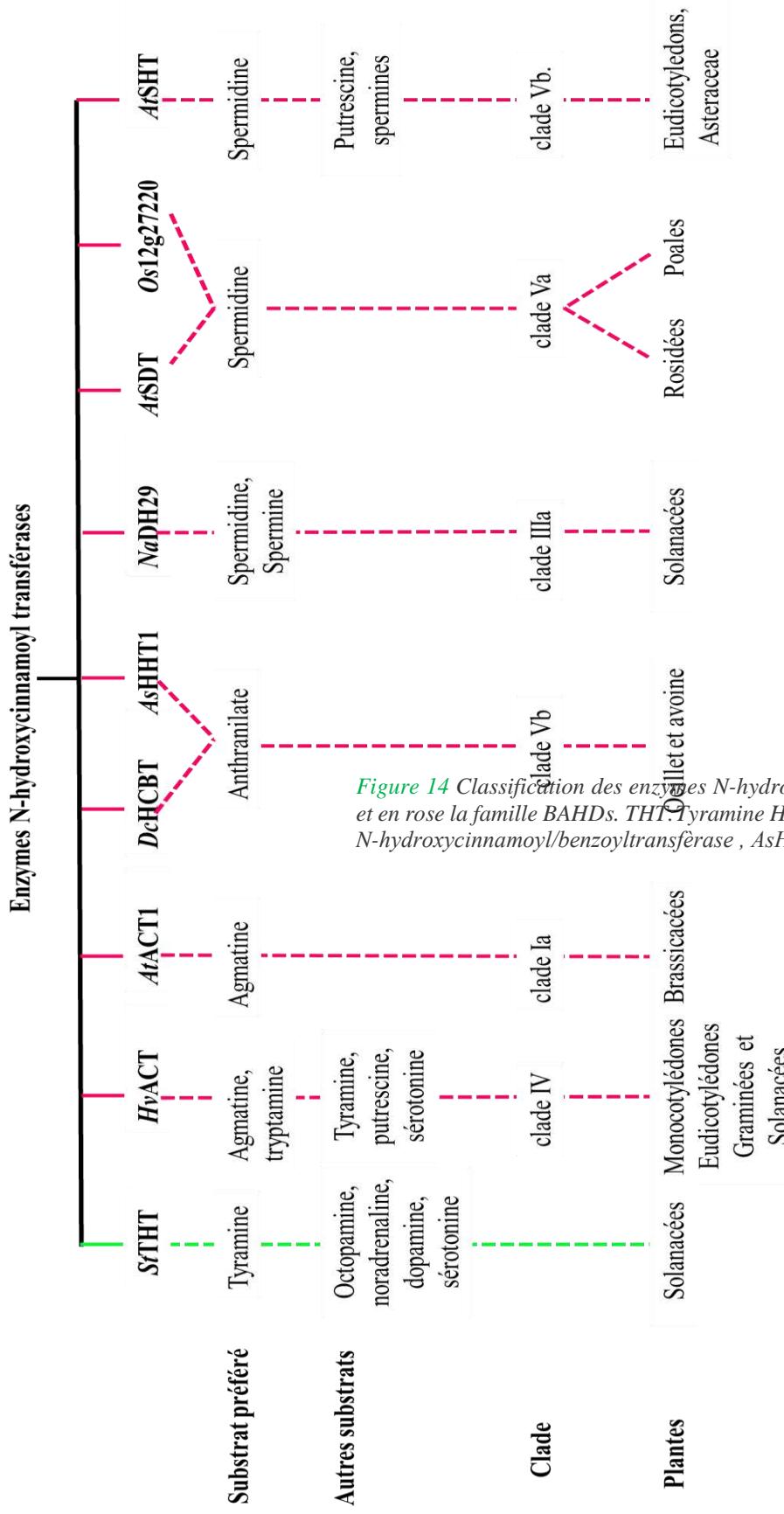


Figure 13 : Biosynthèse des phénolamides

Jusqu'à présent, 43 N-hydroxycinnamoyltransférases ont été isolées et caractérisées. Deux familles d'acyltransférases différentes sont à l'origine des enzymes N-hydroxycinnamoyltransférases. La première est la superfamille des BAHD acyltransférases, qui contient la majorité des enzymes caractérisées. La deuxième est la superfamille GNAT acyltransférases (Gen5-related N-acetyltransferases) (Salah Ud-Din et al., 2016; Vetting et al., 2005). Les enzymes N-acyltransférases peuvent être classées en 9 groupes différents, selon les substrats utilisés et leurs propriétés catalytiques (Roumani et al., 2020a) (Figure 14) .



*Figure 14* Classification des enzymes N-hydroxycinnamoyl transférases. En vert la famille GNAT (G) et en rose la famille BAHDS. THT: Tyramine Hydroxycinnamoyl Transférase, ACT: Agmatine hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase, AsHHTs: Hydroxycinnamoyl-CoA: Hydroxyanthranilate N-

Parmi les N-acyltransférases caractérisées, chez les Solanacées, une putrescine acyltransferase AT1 est responsable de la synthèse de CP, une spermidine transférase, DH29, catalyse la première étape de la biosynthèse de la dicaféoyl spermidine et une deuxième acyltransférase, CV86, est potentiellement impliquée dans l'acylation de dérivés spermidines monoacylés (Onkokesung et al., 2012). Deux spermidine transférases *SmSHT* et *SrSHT* ont été caractérisé respectivement chez l'aubergine, *Solanum melongena* (l'aubergine), et une espèce sauvage apparentée, *Solanum richardii* (la morelle de Balbis) (Peng et al., 2016). Elles sont spécifiques des fleurs et catalysent la synthèse de dérivés mono-, bi- et tri- spermidine (Peng et al., 2016). Deux autres acyltransférases, des spermine hydroxycinnamoyl transférases (*SrSpmHT* et *SmSpmHT*) ont aussi été identifiées et caractérisée chez *S. richardii* et l'aubergine (Peng et al. 2019). Ces enzymes permettent la synthèse exclusive de dérivés spermines (Peng et al. 2019).

La tomate synthétise une grande diversité de phénolamides dans le cas d'interaction tomate/pathogènes tels que *p*-coumaroyloctopamine, *p*-coumaroylnoradrénaline, *p*-coumaroyltyramine, feruloyltyramine, *p*-coumaroyldopamine et feruloyldopamine (Röpenack et al., 1998; Zácarés et al., 2007). Ces composés sont synthétisés chez la tomate par une petite famille multigénique codant des tyramine hydroxycinnamoyl transférase (THT) (Röpenack et al., 1998; Zácarés et al., 2007).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre de synthèse bibliographique, Les travaux menés sur la tomate au LAE ont permis d'identifier plusieurs phénolamides dont l'accumulation dans les tissus peut être modulée par l'environnement de la plante. La CP est le phénolamide que l'on retrouve le plus couramment dans l'ensemble des organes de la tomate (tiges, feuilles racines par ordre décroissant d'importance). Son accumulation est diminuée lorsque la fertilisation en azote de la plante est limitée, mais fortement stimulée en réponse à l'infection de *P. syringae* ou de l'herbivorie de *T. absoluta* (Larbat et al., 2014; Royer et al., 2016). Dans le cas précis de l'herbivorie, l'accumulation de CP s'accompagne d'une accumulation très importante d'autres phénolamides comme la tri-dihydrocaféoylspermine, la kukoamine A, la bis-dihydrocaféoylspermidine, la féruloylputrescine ou la feruloyltyramine. Pour aider dans l'étude de l'interaction tomate-*T. absoluta*, des banques RNAseq ont été construites à partir d'ARN de feuilles soumises à 5h et 24h d'herbivorie en comparaison de feuilles saines. En se basant sur les données de la banque ARNseq et les données de la littérature sur l'identification de la putrescine hydroxycinnamoyltransférase AT1 chez *Nicotiana attenuata*, 4 enzymes (*SiPHT1*, *SiPHT2*, *SiPHT3* et *SiPHT4*) ont été caractérisées au LAE avant ma thèse. Ces gènes codent pour des

putrescine hydroxycinnamoyltransférases qui permettent spécifiquement de synthétiser la CP dans les tomates. L'activité *in vitro* de ces 4 enzymes a été montrée par des tests d'incubation mais leurs activités *in vivo* n'ont pas encore été mesurées. Ces 4 enzymes caractérisées présentent des spécificités d'expression spatiale qui permettent de mieux comprendre l'accumulation des dérivés putrescine dans la tomate. Cependant, l'accumulation des dérivés spermidine et spermine dans les feuilles soumises à l'herbivorie indique l'implication d'autres enzymes transférases dans leur synthèse chez la tomate qui ne sont pas connu encore, d'où l'intérêt de chercher des spermidines ou spermine hydroxycinnamoyltransférases, en plus des gènes de régulation.

L'objectif de ce chapitre est d'identifier des gènes de synthèse et de régulation (en plus des 4 SIPHT) impliqués dans le contrôle de la voie de biosynthèse des phénolamides. C'est indispensable de les caractériser afin de pouvoir ensuite contrôler l'accumulation de ces composés élicités par l'herbivorie de *T. absoluta*. Ma stratégie scientifique a consisté à rechercher des gènes candidats par une analyse différentielle dans les banques RANseq de feuilles de tomate infestées ou non par *T. absoluta*, et en comparant avec les travaux sur les autres plantes notamment sur les spermidine/spermine transférase (Onkokesung et al., 2012; Peng et al., 2019) et ceux concernant les facteurs de transcription NaMYC2 et NaMYB8 réalisés sur *Nicotiana attenuata* (Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012). La validation de ces candidats est ensuite réalisée, par expression hétérologue et criblage d'activité *in vitro* (pour les candidats transférases) et par expression transitoire (pour les candidats facteurs de transcription).

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Matériel biologique

**Tomate** (*Solanum lycopersicum* L.). Les graines de tomate de la variété Better Bush (hybride VFN, fournisseur : Tomato Growers) sont mises en germination dans du terreau puis disposées en serre pendant l'hiver et l'automne. Les jeunes plantes sont cultivées pendant 20 jours (après l'apparition des cotylédons), ce qui correspond à une plantule de 4 feuilles bien développées. Les plantes sont utilisées pour l'agro-infiltration.

***T. absoluta***. Des pupes nous ont été fournies par l'institut Sophia Agrobiotech. Les pupes sont mises dans un insectarium avec des plants de tomates pour se développer et boucler leur cycle de vie. L'insectarium est placé dans une serre et alimenté par des plants de tomates d'une façon à maintenir en vie les générations de *T. absoluta* qui se succèdent. Les larves en deuxième et troisième stade larvaire sont utilisées dans les expériences.

***Escherichia coli* MC1022** (génotype : araD139,  $\Delta$ (ara, leu)7697,  $\Delta$ (lacZ)M15, galU, galK, strA) électrocompétentes. Elles sont utilisées pour le clonage et l'amplification des plasmides.

***Escherichia coli* BL21(DE3)** (génotype : F- ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3)) chimiocompétentes. Elles sont utilisées pour l'expression et la production des enzymes transférases.

***Agrobacterium tumefaciens* EHA105** électrocompétentes, souche résistante à la rifampicine (gène RifR) (Hood et al., 1993). Elles sont porteuses du vecteur de surexpression et sont utilisées pour la transformation des tomates.

### 3.2. Matériel génétique

**Banque ARN seq** : Des feuilles de tomate infestées par *T. absoluta* et des feuilles témoins saines (3 répétitions de chaque traitement) sont récoltées 5h et 24h après le dépôt des larves. A partir de 3 $\mu$ g d'ARN par échantillon, 12 banques ARN seq ont été construites en utilisant la technologie Illumina®. La construction des banques et leur analyse statistique ont été sous-traitées par la société Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Dans le détail, les données de séquençage ont été traitées et filtrées à l'aide du logiciel Trimmomatic (Bolger et al., 2014), puis cartographiées sur le génome de la tomate (Build\_4.0) à l'aide du logiciel BWA-MEM (Li et Durbin, 2009). La quantification d'expression de chaque gène (FPKM) a été calculés à l'aide du logiciel FeatureCounts (Liao et al., 2014) et l'analyse d'expression différentielle entre tissus infestés et témoins à chaque date a été menée avec EdgeR (Robinson et al., 2010).

**ADN complémentaire (ADNc)** : l'ADNc utilisé est issu de la réaction de « reverse transcriptase » à partir d'un échantillon d'ARNm généré lors de la construction des banques ARNseq, en utilisant un kit (Kit RNA to cDNA de Life Technologies). L'ARNm provient d'une plante de tomate soumise à 5h d'herbivorie par 6 larves de *T. absoluta*.

**Amorces** : Les amorces utilisées dans ce chapitre sont représentées dans le tableau suivant (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Amorces utilisées.

Utilisation	gène	Amorce directe	Amorce reverse	Description
Clonage dans pGWB2	SIPHT3	ACAAAC <del>GGATCC</del> CATGAAGGTCAAAATAGAAAGTTCAAAATC	ACAA <del>GCGGCCGC</del> TCAAGCAAGATCTAAAGAATAG	Site de restriction BamHI Site de restriction NotI
	SIPHT4	ACAAAC <del>GGATCC</del> CATGAAGATTAAAATAGAAAGTTCAAGAATT	ACAA <del>GCGGCCGC</del> TTAATCTTCAAGCAAGTCCAAGGAATAA	
	Solyc06g083900.2	CAGCTCCAAGTCCCAAGTGA	TCACTAATCTGTCGGCCATT	
	solyc08g076930.1	TCATATATCTCCGCCACCCC	TAAACATGGCCTCGACGAT	
QPCR	TIP41 (gène de ménage)	ATGGAGTTTGAGTCTTCTGC	GCTCGTTCTGGCTTAGG	
	SIPHT1	CTGTAGACGCCCTCGTTGGAC	AGGAGAGCATAGAGGGAGAAGG	
	SIPHT2	TATCGAGAGTGGGCAGGAAG	TCCAATGAGGTGTCCACAGA	
	Solyc06g083900.2	GAGGTCCATGGAGCAAAGAAGA	GCCTACAACTTTCCGCACC	
Clonage dans pET28-a	Solyc07g008390.1.1	ATCCTC <del>GGATCC</del> ATGCTAAAACACCGCTTATGCAGTTC	ACAA <del>GCGGCCGC</del> CTACTCACAAAGTGAGAGACAATAAAC	Site de restriction BamHI Site de restriction NotI Site de restriction EcoRI
	Solyc02g093180.2.1	ATCCTC <del>GGATCC</del> ATGTGAGCCATGACTCATTAAGTATA	ACAA <del>GCGGCCGC</del> TTAACACGTGTGGAATGTGAA	
	Solyc05g015800.2.1	ATCCTC <del>GGATCC</del> ATGGCACATAATACTATGCCATTCA	ACAA <del>GCGGCCGC</del> TTAACATCTCCAATGGAAGATAA AAAAAAATC	
	Solyc07g008380.1.1	ATCCTC <del>GGATCC</del> ATGGAGTCTAAGTCTTACAAAGA	ACAA <del>GCGGCCGC</del> CTACTCATCAAAATGAAAGACAATAC A	
	Solyc12g005430.1.1	ATCCTC <del>GGATCC</del> CATGGAAATAGGTTTGTAAACGAAAATGA	ACAA <del>GCGGCCGC</del> CTAAAGTTTGCATCGCTATAAAC	
	Solyc03g117600.2.1	ATCCTC <del>GAATT</del> CATGAAGATCGAGGTGAAAACCTAAC	ACAA <del>GCGGCCGC</del> CTAAGGAATTAGCAAAATAAAGATA TGAC	
	Solyc12g096770.1.1	ATCCTC <del>GGATCC</del> CATGGAAATTGAAATCATCCACAAAATTCA	ACAA <del>GCGGCCGC</del> CTAAATTGAAAGAAATCCTGATATC ATTG	
	Solyc12g010980.1.1	ATCCTC <del>GGATCC</del> CATGAAAGATTCAATGCAAGTGACTATTG	ACAA <del>GCGGCCGC</del> CTAAATTGCAAAATCGATGATATCT TGG	

### Plasmides

\* **Le plasmide pCR8®/GW/TOPO®** est utilisé pour le clonage des gènes à partir des produits PCR par simple insertion au niveau de ses extrémités T linéarisées. Les produits PCR doivent avoir une base A à leurs extrémités. J'ai réalisé la réaction d'insertion par une enzyme topoisomérase (kit pCR8®/GW/TOPO® TA cloning, Invitrogen, Carlsbad, CA, Etats-Unis). Ce plasmide porte un gène de résistance à la spectinomycine et les extrémités Gateway® permettant le transfert du gène d'intérêt vers un autre plasmide possédant aussi les extrémités Gateway®.

\* **Le plasmide pGWB2 Gateway binary vector** (BioVector NTCC Inc.) est utilisé pour l'expression des séquences d'intérêt dans les tomates sous le promoteur 35S. Il porte un gène de résistance à la kanamycine et les extrémités Gateway® pour permettre la recombinaison de la séquence d'intérêt dans ce vecteur à partir du plasmide pCR8®/GW/TOPO®.

\* **Le plasmide pBin61 exprimant la TBSV-P19** (Tomato bushy stunt virus protein 19). La protéine P19 exprimée par ce plasmide, permet d'empêcher la mise en place de « silencing » par la plante hôte. L'effet de « silencing » est un processus qui permet à la plante de dégrader l'ADN

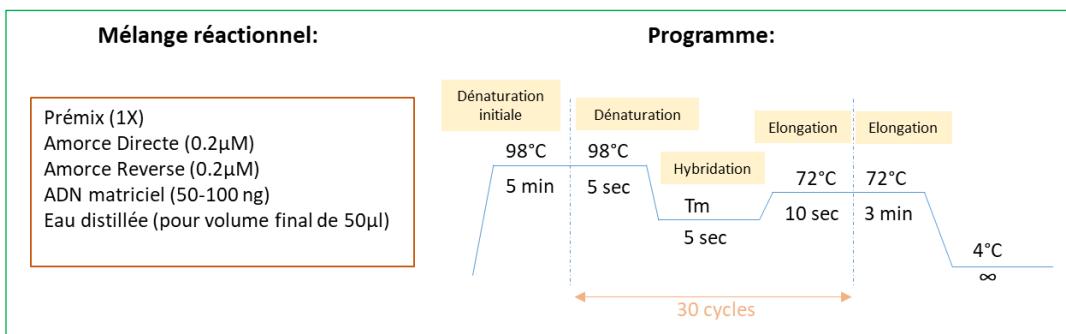
étranger dans ses cellules (Saxena et al., 2011; Mohammadzadeh et al., 2016), ce qui conduirait à dégrader l'ADN que je cherche à insérer transitoirement dans le génome des plantes. Ce vecteur sera utilisé pour transformer des agrobactéries avec lesquelles les solutions d'agro-infiltration des plantes sont préparées.

**\*Le plasmide pET-28a** : Le système pET est le plus adapté pour le clonage et l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli*. Les gènes ciblés sont clonés dans le plasmide sous le contrôle du facteur de transcription T7, et l'expression est induite en fournissant une source d'ARN polymérase T7 dans la cellule hôte. Le plasmide porte l'étiquette His • Tag® / thrombine / T7 • Tag® N-terminale plus une séquence His • Tag C-terminale facultative. J'utilise ce vecteur pour l'expression des protéines transférases.

**\*Le plasmide pMAL™** est utilisé pour l'expression des protéines dans des *E.coli*. Il contient la MBP (protéine maltose ou maltose binding protein) qui est induite par l'IPTG et bien visible en SDS-PAGE. Le vecteur permet d'exprimer la protéine d'intérêt en fusion avec la MBP. Cette fusion permettra d'augmenter la solubilité de la protéine et sa sécrétion dans le cytoplasme ainsi que le périplasme des *E.coli*. Après purification la MBP peut être séparer de la protéine d'intérêt par clivage. Dans mes travaux j'utilise ce plasmide vide comme contrôle de l'induction par IPTG.

### 3.3. Amplification des gènes candidats

Les amplifications des gènes candidats par PCR sont réalisées avec un prémix<sup>3</sup> de PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 2X (Takara Bio Inc.) à partir de l'ADNc. Ce prémix contient une polymérase à haute-fidélité. Le programme d'amplification utilisé est représenté **Figure 15**. Les fragments d'ADN amplifiés sont utilisés pour le clonage et le séquençage.



**Figure 15** : Mélange réactionnel et programme pour la PCR avec prémix de PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 2X

<sup>3</sup> Solution fournie dans le kit. Elle contient un mélange de produits. Elle est utilisée en ajoutant l'ADN et l'eau pour faire le mix réactionnel final.

### 3.4. Migration sur gel d'agarose et récupération des fragments d'ADN

Les produits PCR sont mis à migrer par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% dans du tampon TAE. Le tampon TAE contient du Tris acétate 40 mM, de l'EDTA 5M pH8 et 1.25% d'acide acétique. Le marqueur de taille utilisé est l'Exact Ladder DNA premix 2log (Biolabs). Après migration, le gel est incubé pendant 20 minutes dans un bain de BET 0.04% dilué dans l'eau. L'ADN est ensuite extrait du gel d'agarose avec le kit "Nucleospin Gel and PCR Clean Up" (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) selon le mode opératoire du fournisseur. Enfin l'ADN extrait est stocké à -20°C.

### 3.5. Constructions des vecteurs de surexpression

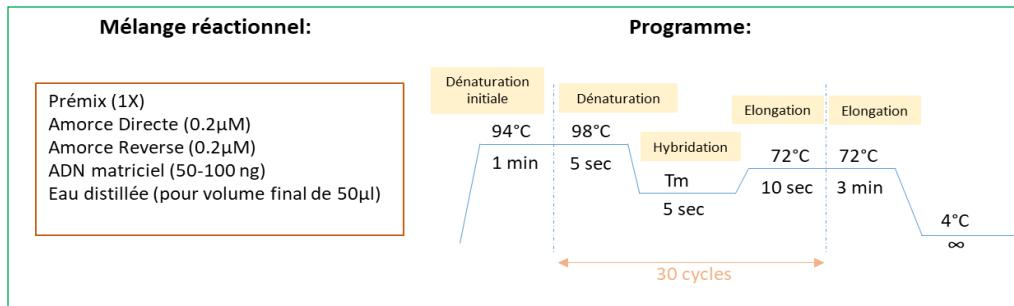
Le clonage est assuré par la technique GATEWAY. Il est réalisé en plusieurs étapes décrites ci-dessous et sur la **Figure 17** :

**a-** Adénylation (ajout des bases A) des extrémités des fragments d'ADN amplifiés par PCR. Elle est réalisée en ajoutant 300-600ng/μl des produits PCR à un mélange réactionnel de "PCR MasterMix 2X" (ThermoFisher Scientific). Le mélange final est incubé à 72°C pendant 40 minutes.

**b-** Ligation des produits PCR à extrémités adénylés dans le plasmide pCR8®/GW/TOPO®. Elle est réalisée selon le mode opératoire du kit dans un volume final de 3 μl. Le mélange réactionnel contient les produits PCR adénylés (200-400 ng/μl), 0,5μl de solution saline diluée au quart et 2ng/μl du vecteur pCR8®/GW/TOPO®. Ce mélange est incubé 2h à température ambiante (20°C-25°C).

**c-** Transformation des bactéries MC1022 électrocompétentes par le produit de ligation dans pCR8®/GW/TOPO®. Elle est effectuée sur un aliquot de 40μl de bactéries électrocompétentes froides, avec 1 à 10 ng de produit de ligation. Les bactéries sont ensuite déposées dans une cuve d'électroporation et électroporées avec le Micropulseur TM (Biorad) sous un courant de 2,5 kV. Juste après le choc, 300μl de LB sont ajoutés dans la cuve. La solution bactérienne est ensuite incubée 1h à 37°C puis étalée sur boîte de Pétri LB+ spectinomycine (100mg/L), placée à 37°C pendant 16 heures.

**d-**Sélection des colonies porteuses des gènes d'intérêt dans le plasmide pCR8®/GW/TOPO®. Elle est réalisée par criblage PCR en utilisant les amores de chaque gène et un prémix, SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 2X (Takara Bio Inc.). Ce prémix contient une polymérase sans activité correctrice. Le programme utilisé pour cette amplification PCR est représenté **Figure 16**.



**Figure 16 :** Mélange réactionnel et programme pour la PCR avec prémix de SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 2X

**e-** Purification du plasmide pCR8®/GW/TOPO® portant le gène d'intérêt. Les colonies positives sont ensemencées dans 4 mL de LB + spectinomycine (100mg/L) à 37°C/180 rpm pendant 16 heures. La purification du plasmide est réalisée avec le kit "NucleoSpin Plasmid" (Macherey-Nagel) en suivant le mode opératoire du fournisseur. Le plasmide, élué dans un volume total de 50 µl, est conservé à -20°C.

**f-** Quantification de l'ADN des plasmides purifiés. Elle est réalisée sur 5µl de produit de purification dilués dans 65µl d'eau osmosée, avec le spectrophotomètre Biophotometer (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). La DO<sub>260nm</sub> de chaque échantillon est mesurée contre un blanc (70µl d'eau osmosée). Quinze µl du plasmide purifié sont envoyés au séquençage pour vérifier la séquence et l'insertion du gène dans le bon sens dans le plasmide pCR8®/GW/TOPO®.

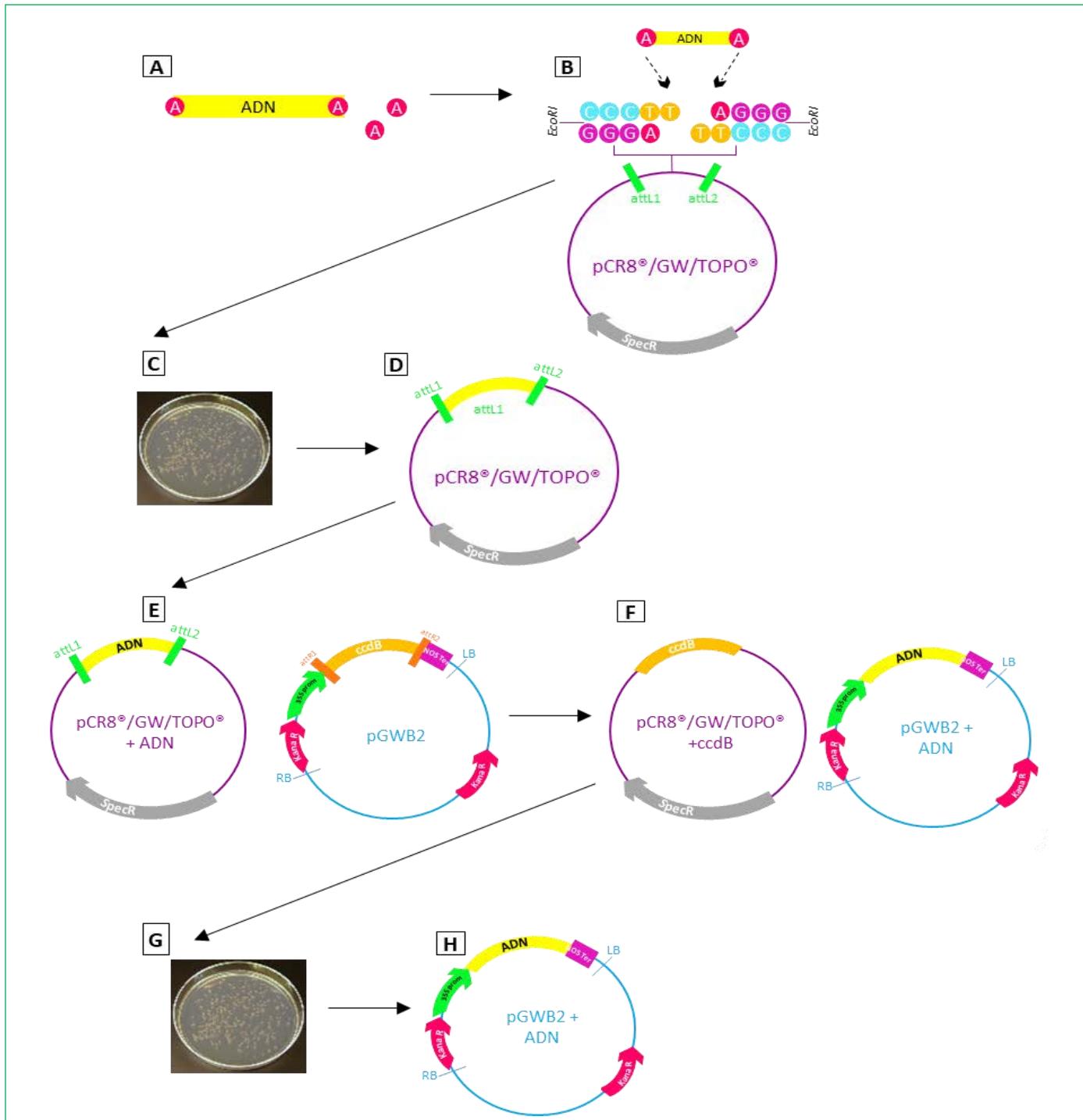
**g-** Recombinaison du gène d'intérêt du plasmide donneur pCR8®/GW/TOPO® vers le plasmide accepteur pGWB2 Gateway binary vector avec le kit "Gateway LR Clonase® II Enzyme Mix" (Thermofischer Scientific). Elle est effectuée selon le mode opératoire du fournisseur. Le mélange réactionnel est composé de 50-150ng du plasmide donneur pCR8®/GW/TOPO® contenant le gène d'intérêt, 1µl du plasmide pGWB2 (150ng/µl), 2 µl d'enzyme LR Clonase™ et de tampon TE pour un volume final de 8µl. Le mélange est incubé 1 heure à 25°C, puis 10 minutes à 37°C après l'ajout de 1 µl de protéinase K.

**h-** Transformation des *E. coli* MC1022. Elle s'effectue avec le produit de ligation en suivant la même procédure de transformation jusqu'à la sélection des colonies porteuses du plasmide pGWB2 avec le gène d'intérêt. La seule chose qui change est l'utilisation de la kanamycine à la

place de la spectinomycine. Ensuite le plasmide est purifié comme décrit dans l'étape de purification précédente et dosé de la même façon.

**i-** Transformation des *A. tumefaciens* EHA105. Elle est réalisée avec le plasmide pGWB2 contenant le gène d'intérêt de la même manière que la transformation des *E.Coli* MC1022 en incubant 4 heures à 28°C/180 rpm avant d'étaler sur milieu solide LB+ kanamycine, et en plaçant les boîtes de pétri à 28°C pendant 48 heures.

**j-** Sélection des colonies positives porteuses de la construction pGWB2 contenant le gène d'intérêt. Elle est effectuée par criblage PCR en utilisant les amorces de chaque gène. C'est avec ces colonies d'*A. tumefaciens* positives que les plantes sont transformées.



**Figure 17 :** Construction des vecteurs de surexpression ; A : Etape d'adénylation : ajout des nucléotides A aux extrémités du fragment d'ADN. B : Insertion du fragment d'ADN dans le plasmide PCR8®. C : Transformation des bactéries et sélection des colonies qui ont poussé sur le milieu LB+ spectinomycine. D : Purification du plasmide PCR8® qui contient le fragment d'ADN, à partir des colonies positives. E : Réaction de recombinaison entre le plasmide PCR8® purifié et le plasmide pGWB2. F : Transfert du fragment d'ADN dans pGWB2. G : Transformation des bactéries avec le produit de la réaction de recombinaison. H : Purification de pGWB2+fragment d'ADN à partir des colonies positives

### 3.6. Transformation transitoire des tomates par agro-infiltration sous vide

La transformation transitoire des tomates est réalisée par la méthode d'agro-infiltration sous vide. Le principe est de remplacer les gaz dans les parties aériennes de la plante par une solution qui contient des agrobactéries en suspension. Ainsi, en appliquant le vide (pression réduite de 1023.6 mbar jusqu'à 50 mbar) autour des parties aériennes de la plante plongée dans un solution d'agrobactéries, les gaz vont sortir des stomates. Le vide est ensuite rompu pour permettre aux agrobactéries de prendre la place des gaz (**Figure 18**).



Les agrobactéries sont ensemencées dans 50 mL de milieu liquide LB (supplémenté de rifampicine à la concentration finale de 20mg /L et de kanamycine à la concentration finale de 50mg/L). Elles se développent toute la nuit à 28°C/180 rpm. Le lendemain, la culture est centrifugée 10 minutes à 6000 rpm. Le surnageant est re-suspendu dans 2mL d'eau osmosée puis centrifugé 10 minutes à 6000 rpm. Cette étape de lavage avec de l'eau osmosée est répétée une deuxième fois. Après le lavage, le culot est re-suspendu dans 1 mL d'eau osmosée et la concentration des agrobactéries est mesurée au spectrophotomètre. Pour la mesure au spectrophotomètre, les cellules sont diluées 100X.

La solution d'agrobactéries pour la transformation des plantes correspond à un mélange d'agrobactéries transformées avec les constructions d'intérêt et d'agrobactéries transformées avec la construction pBin61 exprimant la protéine P19. Les agrobactéries qui expriment les constructions d'intérêt doivent avoir une densité optique à 600 nm (D.O 600nm) finale de 0,2 tandis que les agrobactéries qui expriment la P19 doivent avoir une D.O 600nm finale de 0,4 dans la solution. Les plantes transformées sont mises dans un caisson de confinement pour 4 jours à température ambiante (arrosage tous les 2 jours).

### 3.7. Infiltration des substrats dans les tomates

Les solutions de substrats utilisées dans l'infiltration des feuilles de tomate sont représentées dans le tableau suivant (**Tableau 3**) :

*Tableau 3* : Solutions utilisées pour l'infiltration des plantes

Nom de la solution	Substrat	concentration	Solvant
1	Putrescine	5mM	Eau osmosée
2	Acide caféïque	5mM	DMSO 2%
3	Putrescine + Acide caféïque	5mM	DMSO 2%

Un mL de chaque solution est mis dans un tube Eppendorf dans lequel les pétioles des feuilles de tomates sont plongés. Le tube est disposé dans une caisse de confinement à 28°C pendant 24 heures. La caisse est bien fermée à l'exception de deux petites ouvertures pour permettre l'échange gazeux et la circulation de l'air et placée à côté de la fenêtre pour la lumière. Ainsi les feuilles sont infiltrées par évapotranspiration (prélèvement de solution par le pétiole de la feuille).

### 3.8. Infestation des tomates transformées par *T. absoluta*

Six larves au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> stades larvaires sont déposées délicatement à l'aide d'un pinceau humide sur trois feuilles d'un plant de tomate (3 larves/ feuille). Les feuilles sont entourées par des sachets en tissus (petites mailles) pour bloquer la migration des larves et permettre la transpiration et la photosynthèse des feuilles (**Figure 19**). Les larves se nourrissent sur les feuilles pendant 4 jours.



*Figure 19* : Infestation des feuilles de tomate par *T. absoluta*

### **3.9. Récolte et broyage de matière fraîche**

Les feuilles de tomate sont récoltées, rincées à l'eau distillée pour éliminer toutes traces d'agrobactéries puis congelées immédiatement dans de l'azote liquide. Le broyage est réalisé avec un mortier et un pilon en présence d'azote liquide. Deux cent mg sont pesés dans pour l'extraction des phénolamides et 100 mg sont pesés pour l'extraction des ARNm. Les échantillons sont conservés à -80°C.

### **3.10. Extraction des ARN des plantes transformées**

L'extraction des ARN totaux est réalisée à partir d'une poudre de feuille broyée à l'azote liquide et congelée à -80°C dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL, en suivant les recommandations du fournisseur du kit "E.Z.N.A ® SP Plant RNA kit" (Omega Bio-tek). Les ARN sont élués dans 50 µl d'eau RNase. La migration sur gel d'agarose par électrophorèse est réalisée sur les ARN pour valider leur présence. L'ADN génomique résiduel est dégradé par l'enzyme "Amplification Grade DNase" (Sigma-Aldrich). Enfin, une PCR avec les amores du gène est réalisée pour valider l'absence d'ADN génomique et les ARNs extraits sont dosés par spectrophotométrie et stockés à -80°C.

### **3.11. PCR quantitative (qPCR)**

Le niveau d'expression des gènes dans les plantes transformées est quantifié par PCR quantitative. La molécule fluorescente, le SYBER® Green, est utilisée comme indice de quantité d'ADN dans l'échantillon. En effet, le SYBER® Green s'intercale dans le sillon de l'ADN ; ainsi, sa fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN produits par PCR. Le mélange réactionnel contient, du Master Mix TB green Go Taq 2X (qui contient le SYBER Green en plus de la polymérase « Taq », un standard de fluorescence le carboxyrhodamine (ROX), les amores gène-spécifiques, l'ADNc (5ng/µl) et de l'eau ultra pure. L'ADNc est préparé par une réaction de reverse transcriptase à partir de l'ARNm extrait des tomates transformées. L'ADNc est diluée à une concentration de 5ng/µl. Le mélange réactionnel est préparé sans l'ADNc et répartis dans les puits d'une plaque " MicroAmp Fast Optical 96-well Reaction Plate with Barcode (0,1 mL) (Applied Biosystem) (15µL/puit). Cinq microlitres de l'ADNc sont ensuite ajoutés sur chaque puit. Une fois que le chargement de la plaque est terminé, une centrifugation permet d'incorporer l'ADNc dans le milieu réactionnel en même temps dans tous les puits et l'élimination des bulles d'air (une minute à 80g). Un film "iCycler iQ Opticaltape" (Bio-Rad) est ensuite appliqué sur la plaque pour éviter la contamination et l'évaporation des échantillons dans les puits. Enfin, la plaque est placée dans l'appareil "StepOne Plus System" (ThermoFischer Scientific) pour réaliser la réaction PCR et

quantifier l'ADN. Le gène de tomate TIP41 a été utilisé comme gène de référence d'expression stable, ou "gène de ménage" (Lacerda et al., 2015a). Les différentes amorces utilisées sont présentées dans le **paragraphe 3.2** de ce chapitre.

### 3.12. Extraction des phénolamides

L'extraction est réalisée dans du méthanol à partir de 200 mg (matière fraiche, MF) de poudre de feuille broyée à l'azote liquide et congelée à -80°C dans des tubes Eppendorf de 2 mL. L'extraction consiste à resuspendre les 200 mg dans 1mL de méthanol 100% et 50 µl de taxifoline (2mg/mL) (standard interne), puis incuber ce mélange une nuit à température ambiante. Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré et le culot re-suspendu à part dans 1 mL de méthanol 100% à température ambiante pendant une journée. Les surnageants récupérés après une centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm sont ajoutés aux autres surnageants. Ils sont ensuite passés au speed vacuum jusqu'à évaporation totale du méthanol, pendant une nuit. Le culot est repris dans 500µl de méthanol 70% bien mélangés puis passés à la centrifugation (pendant 5 minutes à 13000 rpm). Enfin, les surnageants sont filtrés dans des fioles pour l'analyse UPLC.

### 3.13. Constructions pour l'expression des enzymes transférases

L'expression des candidats transférases à partir des gènes correspondants se déroule en plusieurs étapes représentées dans la **figure 20**. Pour rappel, chaque gène est amplifié et purifié à partir de l'ADNc selon les **paragraphes 3.3 et 3.4**. Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes, permettent d'ajouter les sites de restriction des enzymes BamHI et NotI respectivement sur les extrémités 5' et 3' du gène. Ces sites permettent de couper les gènes par digestion puis de les insérer dans le plasmide pET-28a par ligation.

**a-** Le gène est cloné dans le plasmide pCR8®/GW/TOPO®, selon les étapes décrites dans le **paragraphe 3.5 (a, b, c, d, e, f)**. Le clonage dans pcr8 permet de vérifier la séquence du gène, par séquençage, avant de l'insérer dans le vecteur d'expression pET-28a.

**b-** Une fois séquencé, le gène est libéré du plasmide pCR8®/GW/TOPO® par digestion avec les enzymes BamHI et NotI. En parallèle, en utilisant les mêmes enzymes, le plasmide pET-28a est linéarisé. La digestion est réalisée pendant 1 h à 37°C, avec 0.5 µl de chaque enzyme, 2 µl d'une solution tampon « FastDigest Green10X », 7µl du plasmide et 10 µl d'eau ultra pure pour avoir un volume total de 20 µl.

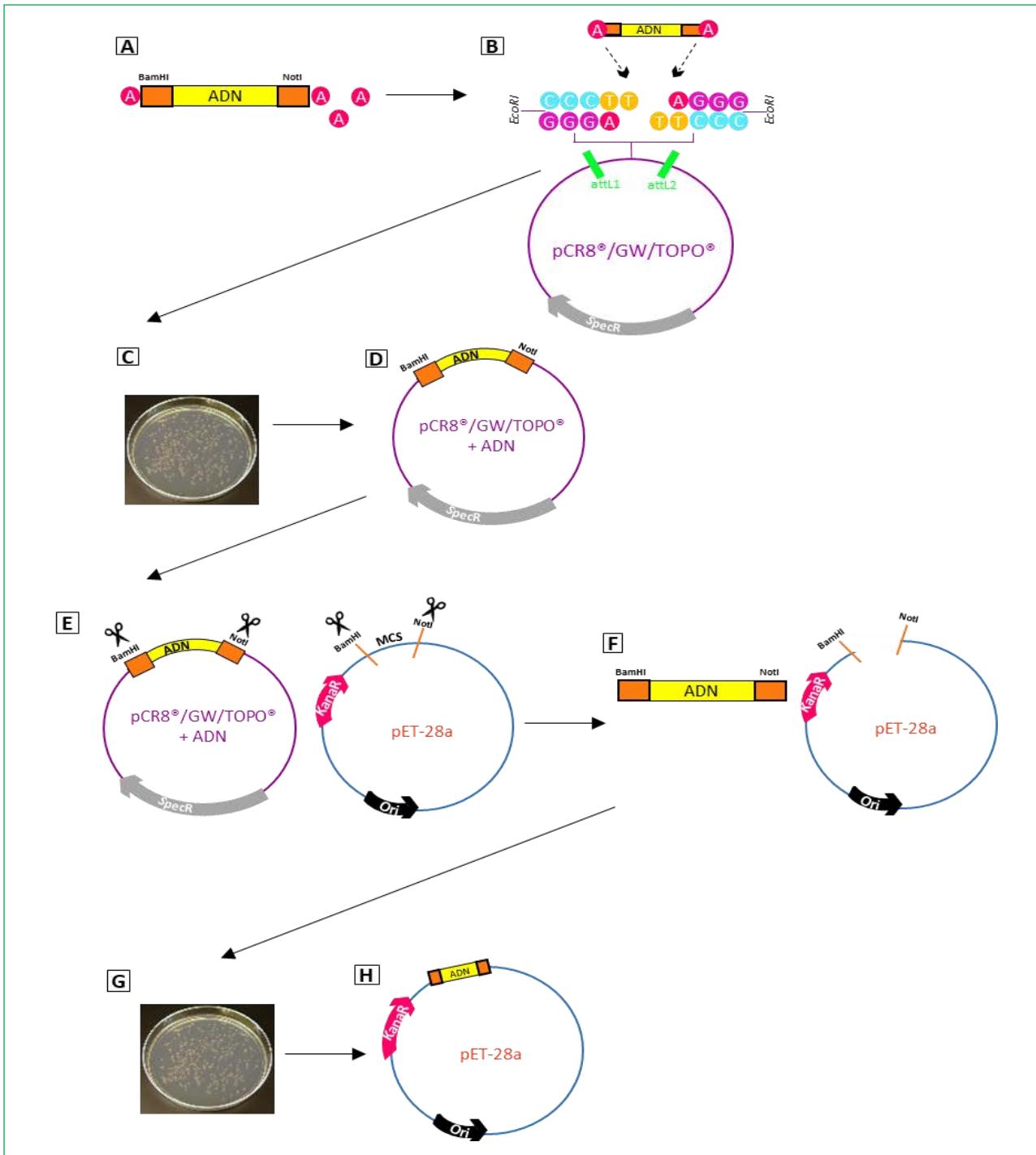
**c-** Les produits de digestion sont mis à migrer sur gel d'agarose 1% par électrophorèse puis purifiés avec le kit "Nucleospin Gel and PCR Clean Up" (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) selon le mode opératoire du fournisseur puis dosés.

**d-** Ensuite, le gène issu de la purification est inséré dans le plasmide pET-28a linéarisé par ligation. Cette ligation est réalisée avec un ratio moléculaire de 3/1 du gène par rapport au plasmide, 1 $\mu$ l de l'enzyme « T4 DNA ligase 1U/ $\mu$ l », 2 $\mu$ l du tampon « 10X T4 DNA Ligase » fourni avec l'enzyme, et complété avec de l'eau ultra pure pour obtenir un volume total de 20 $\mu$ l. Le mélange réactionnel est incubé 30 minutes à 22°C.

**e-** Deux  $\mu$ l du produit de ligation sont utilisés pour transformer les bactéries MC1022 électrocompétentes comme dans **le paragraphe 3.5 (c)** sauf que les bactéries sont étalées sur des boites de pétri contenant LB et de la kanamycine (50mg/L). La sélection des bactéries qui portent le plasmide pET-28a+ le gène, est réalisée par réaction PCR comme dans **le paragraphe 3.5 (d)** et ainsi que la purification et le dosage du plasmide en suivant les mêmes étapes du **paragraphe 3.5 (e et f)**.

**f-** Enfin, 1 $\mu$ l du plasmide purifié est utilisé pour transformer par choc thermique un aliquots de 40 $\mu$ l de bactéries *E.Coli* BL21(DE3). Les bactéries sont sorties du congélateur à -80°C et incubées pendant 30 minutes sur glace en ajoutant 1  $\mu$ l du plasmide. Un choc thermique est réalisé en incubant les bactéries 45 secondes à 42°C, puis sur glace pendant 2 minutes. Ensuite 300 $\mu$ l de LB sont ajoutés sur les bactéries et la solution est incubée 1h à 37°C puis étalée sur boite de Pétri LB+ kanamycine (50mg/L), placée à 37°C pendant 16 heures.

**g-** La dernière étape consiste à vérifier la présence du plasmide dans les *E. coli* BL21(DE3) qui ont poussé par criblage PCR comme décrit dans **le paragraphe 3.5 (d)**.



**Figure 20 :** Les différentes étapes de la construction des plasmides d'expression des candidats transférase. A : Adénylation des extrémités du gène ciblé. B/ Insertion du gène dans le plasmide PCR8®. C : Transformation des bactéries par le produit obtenu à l'étape précédente et sélection des colonies positives qui ont poussé sur du milieu LB + spectinomycine. D : Purification du plasmide PCR8® contenant le gène d'intérêt à partir des colonies positives. E : Réaction de digestion avec les enzymes BamHI et NotI. F : libération du gène d'intérêt à partir du plasmide PCR8® et linéarisation du plasmide pET-28a. G : Ligation par l'enzyme T4 ligase du gène dans le plasmide pET-28a. et transformation des bactéries avec le produit de la ligation. H : sélection des colonies positives qui ont poussé sur du milieu LB+ kanamycine, et purification du plasmide. MCS : Sites multiples de restriction

### **3.14. Induction et production des protéine transférases**

L’induction de la production des enzymes transférases est réalisée dans les bactéries BL21 DE3 (paragraphe 4.1). Une colonie de ces bactéries est ensemencée dans une préculture de 5mL LB+ Kanamycine (50mg/L) et mise en culture pendant une nuit à 37°C avec agitation à 180 rpm. Cinq cents  $\mu$ l de cette préculture sont utilisés pour ensemencer 50 mL de culture liquide LB+ kanamycine (50mg/L). Une fois que la D.O<sub>600nm</sub> de la culture est comprise entre 0.5 et 0.6, la culture est induite avec 1mM d’IPTG et incubée pour 22 heures à 18°C et sous agitation à 180 rpm. Après 22 heures de culture, les bactéries sont récupérées par une centrifugation de 15 minutes à 4°C à une vitesse de 5000g. Ensuite les bactéries sont stockées à -20°C.

### **3.15. Extraction et purification des protéines transférases**

Cette technique de purification se base sur la détection et l’attachement des extrémités His-tag des protéines ciblées sur un mélange sur des billes de cobalt. Les protéines sont ensuite libérées des billes par l’utilisation d’imidazole. Les bactéries BL21 DE3 collectées dans le paragraphe 4.15, sont re-suspendues dans 1 mL du tampon PS8 (phosphate de sodium 50Mm, chlorure de sodium 300Mm, PH=8) + 10 mM Imidazole, dans un tube Eppendorf de 2 mL. La membrane des bactéries est ensuite lysée par sonication (3 cycles à une puissance de 45%). Chaque cycle de sonication est de 30 secondes. Les bactéries sont laissées sur glace pendant 30 secondes entre chaque cycle de sonication afin de limiter leur réchauffement. Après la sonication, la solution des bactéries est centrifugée pendant 15 minutes à 4°C avec une vitesse de 10000g. Les surnageants sont récupérés et utilisée pour la purification, alors que le culot (débris cellulaires) est jeté. Cent  $\mu$ l des surnageants sont gardés et utilisés pour des tests d’activité enzymatique. La purification de la protéine à partir des surnageants est réalisée grâce à des billes cobalt de haute affinité en suivant le mode opératoire du fournisseur (sigma-aldrich, H8162, HIS-Select® Cobalt Affinity Gel). Les billes de cobalt sont fournies sous forme d’un gel qu’il faut suspendre délicatement par agitation circulaire avant leur utilisation. Elles peuvent être stockées à 4°C. Cent  $\mu$ l de ce gel sont mis dans un tube Eppendorf de 1.5 mL et utilisés pour la purification des surnageants de sonication. Deux cents  $\mu$ l d’eau ultra pure stérile sont ajoutés au 100 $\mu$ l du gel puis la solution est agitée délicatement et centrifugée pendant 2 minutes à 4°C avec une vitesse de 5000g, puis les surnageants sont jetés. Cette étape de lavage est répétée à l’identique une deuxième fois, puis une troisième fois mais avec 1 mL de tampon PS8 contenant 20mM d’imidazole. Un mL des surnageants de sonication est ajouté sur les billes dans le tube Eppendorf 1.5 mL et le mélange est incubé pendant 30 minutes dans un agitateur orbital, sous agitation à 175 rpm à 4°C. Après les 30 minutes, le mélange est centrifugé pendant 2

minutes à 4°C avec une vitesse de 5000g et les surnageants sont jetées. Trois lavages successifs sont réalisés avec 1 mL de tampon PS8 contenant 20mM d'imidazole, en jetant les surnageants après chaque lavage. Enfin, les billes de cobalt dans le tube de 1.5 mL sont re-suspendues doucement dans 100µl de tampon PS8 contenant 250mM d'imidazole et sont incubées pendant 30 minutes dans un agitateur orbital, sous agitation à 175 rpm à 4°C. Le mélange est centrifugé pendant 2 minutes à 4°C avec une vitesse de 5000g et les surnageants (protéines) sont récupérés et utilisés immédiatement pour faire des tests d'incubation enzymatiques. Un aliquot de 50µL de chaque étape de la purification a été gardé pour suivre l'efficacité de ce protocole de purification par SDS-PAGE (**paragraphe 3.18**).

### 3.16. Test d'incubation enzymatique

Les tests d'incubation enzymatiques sont réalisés dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL dans un volume total de 100µl en utilisant 10µl de l'enzyme purifiée ou des surnageants de sonication. Le milieu d'incubation contient 5mM d'EDTA, 40 à 100 µM d'ester CoA (caféoyl-CoA, coumaroyl-CoA, féruloyl-CoA ou dihydrocaféoyl-CoA), 5 à 10 mM de polyamines (putrescine, spermidine, spermine ou kukoamineA/B) et complété avec du tampon TrisHCl 0.1M (pH=9) pour avoir un volume total de 100µl. Ensuite, le mix réactionnel est incubé 1 heure à 30°C puis la réaction est arrêtée en ajoutant 10µl d'acétonitrile HCl (99/1). Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à une vitesse de 13200 rpm. Puis la solution est filtrée (filtre 0,2µm) à l'aide de seringues et mise dans des flacons en vue de leur analyse en UPLC (**paragraphe 3.19**).

### 3.17. Préparation des esters de CoenzymeA

Les esters CoA sont préparés dans 1 mL de milieu réactionnel contenant 0.2mM des acides phénoliques (acide caféïque, acide coumarique, acide férulique ou acide dihydrocaféïque), 1mM DTT (dithiothréitol), 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM d'ATP (dissout dans 0.1M de NaPi), Coenzyme A (0.2 Mm), et 0.02 mg/mL de l'enzyme 4CL (4-coumarate : Coenzyme A ligase) le tout dans un tampon NaPi à 0.1M (pH=7). Le mélange réactionnel est incubé à température ambiante, sans agitation et à l'obscurité pendant 30 minutes jusqu'à l'apparition d'une légère coloration jaunâtre. La formation des esters CoA peut être suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde  $\lambda_{\text{max}}$  333 nm (pour coumaroyl-CoA) et 346 nm (pour caféoyl- et féruloylCoA) contre un témoin sans CoA (Meng and Campbell, 1997).

### 3.18. SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide en condition dénaturante (SDS-PAGE) permet de séparer les protéines en fonction de leurs masses moléculaires. En effet les molécules de dodécylsulfate de sodium (SDS) dans le gel vont se fixer sur la protéine au ratio d'environ une molécule de SDS pour deux acides aminés. Cela permet la dénaturation de la protéine et l'acquisition des charges négatives proportionnelles à la longueur de la chaîne peptidique. Le gel est parcouru par un courant électrique (120 V du pôle négatif vers le pôle positif pendant une heure) entraînant une migration (variables selon leur poids moléculaires) des protéines vers le pôle positif. Le gel est divisé en deux parties. La première permet la concentration des protéines et elle est composée de 5% d'acrylamide, 125mM de Tris HCl (pH6.8), de 1% SDS, de 0.1% tétraméthyléthylènediamine (TEMED), 0.1% de persulfate d'ammonium (APS) et d'eau distillée pour un volume final de 5mL. La deuxième partie du gel permet la séparation des protéines et elle est composée de 10% d'acrylamide, 375 mM de Tris HCl (pH 8.8), de 1% SDS, 0.08% de TEMED, de 1% d'APS et d'eau distillée pour un volume final de 10 mL. La visualisation des protéines sur le gel est possible grâce à l'addition de tampon de charge 1X (Tris HCl 125 mM pH 6.8, SDS 5%, glycérol 20%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0.05%, DTT 400 mM) sur les échantillons qui seront ensuite chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Un marqueur de masse moléculaire (ProSieveTM QuadColorTM protein marker, 4.6 kDa-300 kDa, Lonza Rockland Inc, Rockland, ME, Etats-Unis) est utilisé pour déterminer la taille des protéines. La migration du gel est réalisée dans une cuve de migration contenant du tampon de migration (Tris/Glycine 1X pH 8.3).

Cette méthode me permet de vérifier la production de la protéine par les bactéries BL21 DE3, et cela en comparant le profil protéique des bactéries avant et après induction par IPTG. La présence d'une nouvelle bande après induction, à la taille attendue, représente la protéine cherchée. Ainsi une fois que la D.O.  $_{600\text{nm}}$  de la culture bactérienne atteint une valeur de 0.6, je préleve 1 mL de cette culture, je la centrifuge 30 secondes à une vitesse de 11000g. Ensuite je reprends dans 50 $\mu$ l de PBS 1X (phosphate salin : 137mM de NaCl, 2.7mM de KCl, 10mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, et 1.76mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) que je conserve à -20°C. Après 22h d'induction, je prélève 1 mL de la culture bactérienne qui est conservé à -20°C après les mêmes opérations que décrites auparavant. J'ai utilisé ces prélèvements comme échantillons pour le gel SDS-PAGE.

### **3.19. UPLC-MS**

Les analyses phytochimiques sont réalisées en chromatographie liquide à ultra-haute performance (UPLC) (Chaine UPLC Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japon), équipée d'un détecteur UV SPDM20A (Shimadzu) et couplée à un spectromètre de masse à simple quadripôle LCMS2020 (Shimadzu). La colonne utilisée pour la séparation des phénolamides est une C18 en phase inverse (ZORBAX Eclipse Plus 150 ou 100 × 2,10 mm ; taille de particule = 1,8 µm ; Agilent Technologies) équipée d'une pré-colonne (1290 Infinity, Agilent Technologies). L'élution est réalisée dans du méthanol additionnée de 0.1% d'acide formique et de l'eau ultra pure contenant 0.1% d'acide formique. Le débit est de 0,2mL/minute et le volume d'injection est de 5µl. De manière générale, les analyses sont réalisées en enregistrant le spectre UV entre 200 et 600nm ainsi que le TIC (total ion chromatographie) en ionisation positive et négative sur la gamme de m/z 100-1200. Dans le cas précis des criblages d'activité enzymatiques une analyse en SIM (Selected Ion Monitoring) a été conduite en ciblant les produits de métabolisation attendus. Les données sont traitées par le logiciel LabSolution puis exportées sous tableur Excel.

### **3.20. Analyses statistiques**

La normalité des valeurs obtenus pour les différents traitements est validée en traçant l'histogramme de distribution. La moyenne des répétitions de chaque traitement, les variances, les écart-types et les erreurs standards sont calculés. Les moyennes sont représentées sur les histogrammes et les erreurs standards sont utilisées comme barres d'erreurs. La significativité des différences observées est calculée en utilisant le « Student test ou T.test » et la valeur de p est ainsi déterminée. Si p<0.05 les différences entre les moyennes sont considérées significatives.

## **4.Résultats**

### **4.1. Identification des gènes candidats impliqués dans l'accumulation de phénolamides chez la tomate**

#### **4.1.1. Identification par BLAST protéique**

Pour identifier des gènes candidats impliqués dans la régulation de l'accumulation de phénolamides chez la tomate, notre stratégie a consisté à rechercher des orthologues de gènes caractérisés chez *N. attenuata*. Je me suis concentrée sur la recherche d'orthologues des facteurs de transcription *NaMYB8* et *NaMYC2*, tous deux impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des phénolamides en réponse à un stress herbivorie (Onkokesung et al. 2012; Woldemariam et al. 2013). Ces deux facteurs de transcription sont positionnés assez haut dans la

voie de régulation ce qui en fait des candidats de choix dans l'optique de moduler l'accumulation d'un ensemble de phénolamides. La disponibilité du génome de la tomate (<https://solgenomics.net/>) m'a permis de réaliser cette recherche par le biais d'une analyse BLAST protéique en prenant comme séquence de référence, la séquence protéique de *NaMYB8* et *NaMYC2* contre les séquences traduites du génome de tomate.

L'analyse BLAST en utilisant comme référence la séquence protéique de *NaMYB8* a permis de révéler 4 candidats présentant une identité supérieure à 45% sur l'intégralité de leurs séquences (**Figure 21**). Sur la base de cette analyse le gène Solyc06g083900.2 ressort avec une identité protéique de l'ordre de 67% en comparaison de *NaMYB8*. Une analyse BLAST basée sur la séquence nucléotidique de *NaMYB8* fait de nouveau ressortir le gène Solyc06g083900.2 avec une identité nucléotidique de l'ordre de 79% (**voir Figure 77 en annexe**).



**Figure 21 :** Les gènes dont la séquence protéique présente des homologies avec la protéine du gène *NaMYB8* chez la tomate par BLAST sur le génome de la tomate (<https://solgenomics.net/>). Les séquences d'acides aminés homologues sont représentées en couleur selon leurs nombre, Query length nombre d'acides aminés de la séquence protéique de *NaMYB8*, ID% : pourcentage d'homologie.

La même analyse a été conduite avec les séquences protéiques et nucléotidiques de *NaMYC2*. L'analyse BLAST sur les séquences protéiques a permis d'identifier un seul gène (Solyc08g076930.1) codant une protéine avec une identité au-delà de 71% sur l'ensemble de la séquence (**Figure 22**). Un second gène (Solyc08g005050.2) présente une forte identité avec *NaMYC2* dans les régions N- et C-terminale de la séquence protéique (**Figure 22**). L'analyse BLAST sur les séquences nucléotidiques de *NaMYC2* fait ressortir le gène **Solyc08g076930.1** en premier avec une identité nucléotidique de l'ordre de 83.19%. Alors que le gène Solyc08g005050.2 ressort en deuxième, avec une homologie nucléotidique de 75.15% et 86.40% respectivement dans les régions N et C terminales du gène (**voir Figure 78 en annexe**).



**Figure 22 :** Les gènes dont la séquence protéique présente des homologies avec la protéine du gène *NaMYC2* chez la tomate par BLAST sur le génome de la tomate (<https://solgenomics.net/>). Les séquences d'acides aminés homologues sont représentées en couleur selon leurs nombre, Query length nombre d'acides aminés de la séquence protéique de *NaMYC2*, ID% : pourcentage d'homologie.

#### 4.1.2. Etude du niveau d'expression de gènes candidats dans les feuilles de tomates soumises à l'herbivorie de *T. absoluta*

Afin de conforter l'identification des gènes **Solyc06g083900.2** et **Solyc08g076930.1** comme de possibles orthologues de *NaMYB8* et *NaMYC2* chez la tomate, nous avons vérifié leur niveau d'expression dans des feuilles soumises à l'herbivorie de *T. absoluta*. L'herbivorie induisant l'accumulation de nombreux phénolamides, notre hypothèse était que le niveau d'expression de gènes impliqués dans la régulation de leur biosynthèse serait fortement stimulé. Pour notre analyse nous avons comparé les niveaux d'expression des gènes ressortis de l'analyse BLAST dans les données RNAseq de feuilles de tomates soumise ou non à l'herbivorie de *T. absoluta*.

Parmi les candidats orthologues de *NaMYB8*, Solyc06g08900.2 constitue le gène dont l'expression est la plus induite à 5h et 24h. Une analyse globale des données RNAseq a permis d'identifier que sur les 26411 gènes exprimés dans les feuilles, 4304 sont significativement élicités par l'herbivorie à 24h. En classant les gènes sur la base de l'amplitude de leur induction, Solyc06g083900.2 apparaît dans le top 100 des gènes les plus induits après 5h et 24h (**Tableau 4**). Le même classement réalisé sur les candidats orthologues de *NaMYC2*, a montré que le gène Solyc08g076930.1 constitue le gène qui est le plus induit (Top700) à 5h et 24h et a le plus haut niveau d'expression parmi les candidats (**Tableau 4**).

**Tableau 4 :** Classement et niveau d'expression (au bout de 5h et 24h d'herbivorie) des gènes homologues à *NaMYB8* et *NaMYC2* parmi les 1000 gènes les plus induits selon l'analyse différentielle des banques RNAseq de tomate infestées ou non par *T. absoluta*.

Orthologues	Gènes	Taux d'expression de l'ARN au bout de 5 heures		Taux d'expression de l'ARN au bout de 24 heures		% Homologie	
		Classement selon l'amplitude d'induction	Plantes saines/Plantes infestées	Classement selon l'amplitude d'induction	Plantes saines/Plantes infestées	protéique	nucléotidique
NaMYB8	<b>Solyc06g083900.2</b>	<b>61</b>	<b>11.6 / 1051.66</b>	<b>53</b>	<b>4.6 / 710.6</b>	<b>67.51</b>	<b>77.9</b>
	Solyc06g053610.2	628	14.6 / 46.3	746	9 / 30	46.50	79.40
	Solyc05g055030.1	108	0.3 / 14.3	81	2.3 / 102.6	55.56	75.36
	Solyc09g090130.2	860	20.6 / 48	861	30.3 / 91	47.65	75
NaMYC2	<b>Solyc08g076930.1</b>	<b>462</b>	<b>416.6 / 1689.6</b>	<b>677</b>	<b>235.6 / 846.6</b>	<b>71.25</b>	<b>83.19</b>
	Solyc05g050560.1	235	77 / 662	686	60.6 / 211.33	40.59	77.53
	Solyc10g009290.1	419	73 / 273	419	21.33 / 55.66	47.39	78.70
							41.80

Au final, la combinaison de critères d'homologie et de critères d'expression dans les feuilles de tomates soumises à l'herbivorie nous a permis de révéler les deux gènes Solyc06g083900.2 et

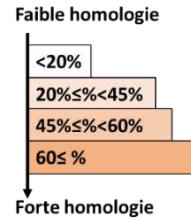
solyc08g076930.1 comme gènes candidats dans la régulation de l'accumulation des phénolamides chez la tomate.

#### 4.2. Identification des gènes codant pour des enzymes N-hydroxycinnamoyl transférases impliquées dans la voie de biosynthèse de phénolamides chez la tomate

Pour identifier des gènes candidats, la stratégie que nous avons adoptée a été de rechercher dans les données différentielle RNAseq des gènes de la famille des acyltransférases, dont l'expression est fortement stimulée dans les feuilles soumises à l'herbivorie de *T. absoluta*. Cette stratégie s'était révélée efficace pour l'identification des gènes *SIPHT1* et *SIPHT2* codant tous deux des putrescine hydroxycinnamoyl transférases et dont le niveau d'expression est parmi les plus fortement induits entre les feuilles témoins et celles soumises à l'herbivorie (*SIPHT2* étant le gène le plus fortement induit à 5h et *SIPHT1* est dans le top100). En suivant cette stratégie nous avons pu identifier 8 gènes annotés « acyltransférase » parmi les 250 gènes les plus induits après 5h et 24h d'herbivorie (en excluant *SIPHT1* et 2) (**Tableau 5**). Ensuite, nous avons regardé l'homologie de ces gènes par rapport à des spermine transférases caractérisées chez les autres plantes et qui présentent des activités enzymatiques capable de donner des phénolamides proches de ce qu'il y a chez la tomate (**Tableau 5**). Notamment les *Sr/SmSpmHT* et *Sr/SmSHT* (spermine et spermidine transférase chez la morelle de Balbis et l'aubergine respectivement) et DH29 et CV86 chez le tabac. De cette comparaison il ressort que 6 des 8 candidats présentent une homologie supérieure à 30% avec au moins une des spermidine/spermine transférases. Les candidats SHT7 et 8 présentent des homologies protéiques de plus de 60% avec CV86 et *Sr/SmSpmHT* respectivement.

**Tableau 5 :** Les gènes candidats pour des spermine et spermidine transférases en fonction de leur classement dans la banque ARNseq et leurs pourcentages d'homologie.

Gènes	Classement selon l'amplitude d'induction		% d'homologie protéique							Nom attribué
	5 h	24 h	SmSpmHT	SrSpmHT	CV86	DH29	SmSHT	SrSHT		
<i>Solyc07g008390.1</i> .1	23	55	39.3	39.3	40.2	44.5	20	19.6		SHT1
<i>Solyc02g093180.2</i> .1	47	86	15.8	15.6	15.5	17	18.2	18		SHT2
<i>Solyc05g015800.2</i> .1	68	126	16.5	16.5	14.8	17.1	19.2	18.2		SHT3
<i>Solyc07g008380.1</i> .1	127	61	40.7	40.7	42.9	45.8	20.8	20.4		SHT4
<i>Solyc12g005430.1</i> .1	142	217	43.5	43.5	51.6	49.5	19.5	18.3		SHT5
<i>Solyc03g117600.2</i> .1	187	477	18.7	19	17.4	18.4	35.8	36		SHT6
<i>Solyc12g096770.1</i> .1	198	307	48.5	48.5	63.1	46.4	21.3	19.9		SHT7
<i>Solyc12g010980.1</i> .1	230	482	70	70.3	51.6	45.9	21.6	20.8		SHT8



## 4.3. Expression des protéines transférases

### 4.3.1. Clonage et construction des vecteurs d'expression des transférases

L'ADNc issus d'ARN de feuilles de tomate (Better Bush) infestées par *T. absoluta* pendant 5h est utilisé comme matrice pour amplifier les gènes candidats (Tableau 2). L'ADNc a permis d'amplifier 5 gènes (SHT3, SHT4, SHT5, SHT7 et SHT8) (Figure 23). Alors que les 3 gènes SHT1, SHT2, et SHT6 n'ont pas été amplifiés, même en utilisant une autre matrice d'ADNc (provenant des feuilles de tomates récoltées Better Bush après 24h d'infestation par *T. absoluta*). En suivant la méthode de clonage décrite dans le paragraphe 3.13, nous avons réussi à cloner les 5 gènes dans le vecteur d'expression pET28-a et à transformer les bactéries *E. coli* BL21 DE3. Les gènes SHT1 et SHT2 ont été synthétisés et clonés dans le vecteur d'expression pET28-a par la société « Genecust ». nous avons ensuite transféré ces deux plasmides dans des *E. coli* BL21 DE3.



Figure 23 : Les constructions dans le vecteur pET28-a des gènes de transférases. Kb : kilobases, les bandes de plus que 3kb représentent des amplifications aspécifiques du vecteur.

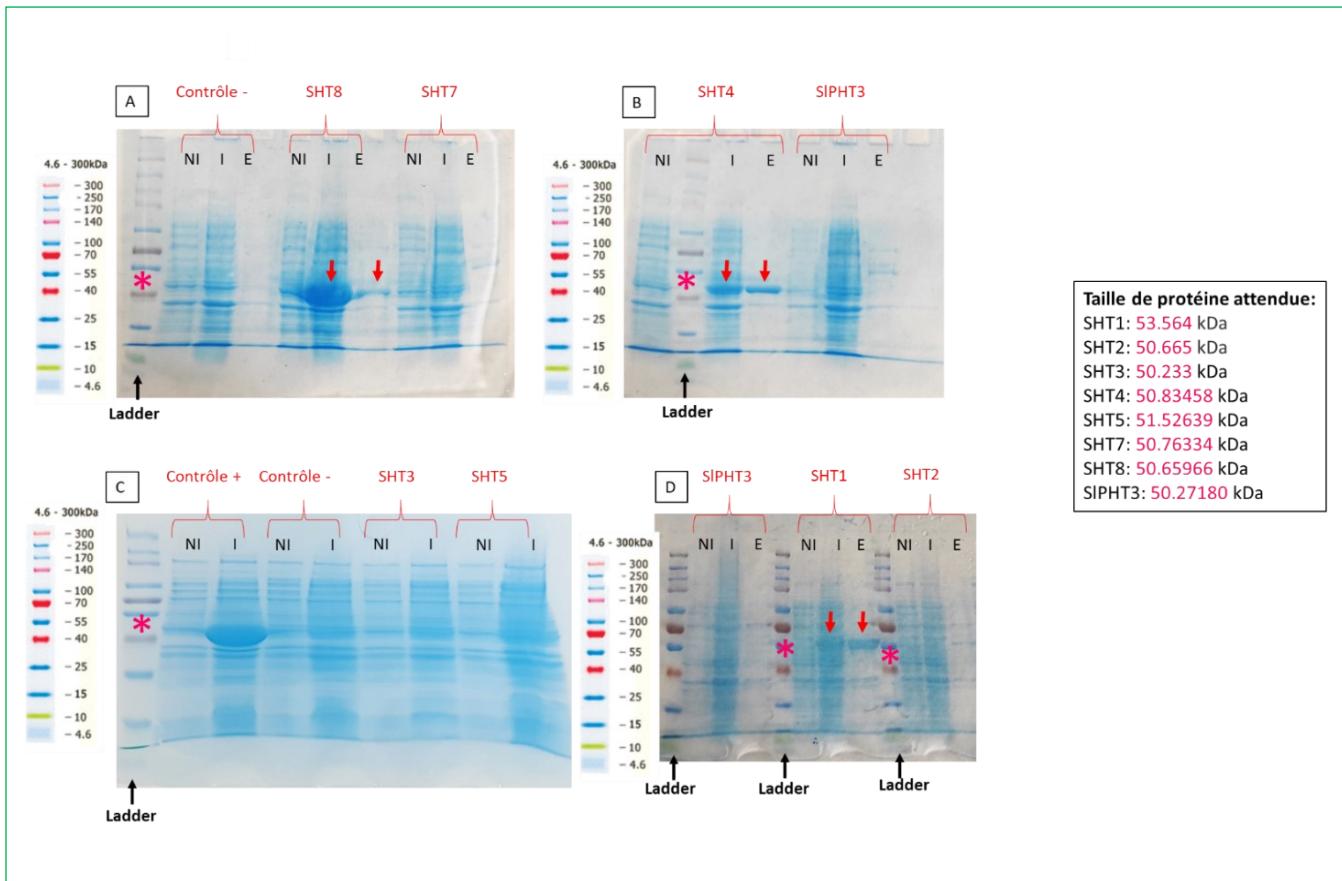
### 4.3.2. Production et purification des protéines transférases

Pour confirmer l'induction de production de nos gènes d'intérêt, nous avons utilisé plusieurs contrôles. Le premier est le vecteur vide pET-28a que nous utilisons comme contrôle négatif pour les analyses de métabolisation. Nous avons également choisi deux contrôles positifs. Tout d'abord, le vecteur pET-28a exprimant le gène *S/PHT3*. *S/PHT3* a été caractérisée comme une putrescine N hydroxycinnamoyl transférase par ce système d'expression. Notre deuxième contrôle positif est constitué de bactérie transformée avec le vecteur pMAL<sup>TM</sup>. Ce vecteur exprime la protéine fixatrice du maltose (MBP : maltose binding protein) sous le contrôle d'un promoteur

inductible par IPTG et donne une grosse bande à 42.5K Da. Ce contrôle nous permet de valider l'induction de l'expression par IPTG (**Figure 24**).

Nous avons procédé à l'expression des 7 gènes candidats dans le BL21 DE3 comme décrit dans le **paragraphe 3.13**. Nous avons vérifié la production des enzymes par SDS-PAGE (**paragraphe 3.18**), (**Figure 24**). Une bande épaisse apparaît à la taille attendue pour le gène SHT8 après induction et aussi pour le gène SHT4 et SHT1 (profil induit I, **Figure 24-B**), en comparant avec le témoin négatif induit. Ces bandes sont moins intense après purification (profil élue E) pour chaque gène (**Figure 24**). Les gènes SHT7 (**Figure 24-A**) et SHT5 (**Figure 24-C**) montrent des profils induits (I) avec des bandes légèrement plus intenses que celles du témoin négatif à la taille attendue, ce qui indique probablement une production de la protéine. Alors que les profils induits (I) des gènes SHT3 (**Figure 24-C**) et SHT2 (**Figure 24-D**) ne présentent pas de différence du profil témoin négatif.

La **Figure 24** montre aussi que la purification des protéines (profil élue E) ne permet pas d'obtenir une bande nette et intense pour la majorité des gènes et même le contrôle positif *S/PHT3*. Par contre pour les deux gènes SHT1 (**Figure 24-D**), SHT4 (**Figure 24-B**) et SHT8 (**Figure 24-A**) la purification permet d'obtenir des bandes nettes à la taille attendue (profil élue E).



Taille de protéine attendue:
SHT1: 53.564 kDa
SHT2: 50.665 kDa
SHT3: 50.233 kDa
SHT4: 50.83458 kDa
SHT5: 51.52639 kDa
SHT7: 50.76334 kDa
SHT8: 50.65966 kDa
SIPHT3: 50.27180 kDa

**Figure 24** : Photos de gel de SDS-PAGE. A : Profil des bactéries transformées par SHT8 et SHT7 en comparant avec le profil des bactéries contrôle négatives. B : Profil des bactéries transformées par SHT4 en comparant avec celui des bactéries transformées avec SIPHT3. C : Profil des bactéries transformées par SHT3 et SHT5 en comparant avec le profil des bactéries contrôle négatives et positives. D : Profil des bactéries transformées par SHT1 et SHT2 en comparant avec le profil des bactéries transformées avec SIPHT3. NI : profil échantillon Non Induit, I : profil échantillon Induit, E : profil protéine élue après purification. Contrôle - : *E. coli* BL21 DE3 transformées avec le vecteur d'expression pET-28a vide, contrôle + : *E. coli* BL21 DE3 transformées avec le plasmide pMAL<sup>TM</sup>, SIPHT3 : le vecteur pET28-a avec le gène SIPHT3 dedans, utilisé comme contrôle positif aussi pour toute la production, et la purification de la protéine. L'astérisque rose représente la taille de la bande attendue et les flèches rouges montrent les bandes des protéines produites.

#### 4.4. Tests d'activité enzymatique

Les tests d'activités enzymatiques sont réalisés comme décrits dans le **paragraphe 3.16**.

Le but de ces tests est de trouver l'activité enzymatique qui permet de synthétiser des dérivés spermine et spermidine chez la tomate, notamment l'enzyme capable de synthétiser le N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. L'activité enzymatique du gène SIPHT3 est utilisée comme témoin positif du milieu réactionnel, des conditions et des substrats utilisés, puisque son activité enzymatique a préalablement été caractérisée.

Les surnageants de sonication des bactéries transformées avec le vecteur pET28-a vide sont utilisés comme témoin négatif. Dix  $\mu$ l des surnageants de sonication des bactéries transformées

avec les vecteurs pET28-a contenant les gènes SHT1, SHT2, SHT3, SHT4, SHT5, SHT7, SHT8 sont utilisés pour les réactions enzymatiques (**paragraphe 3.16**). Les différents substrats utilisés sont représentés dans le **Tableau 6**. Les analyses à l'UPLC des milieux réactionnels après incubation, n'ont pas permis de révéler la présence des produits attendus. Le contrôle positif en revanche a permis de confirmer que les conditions d'incubation étaient compatibles avec une activité de type N-transférase (activité PHT dans ce cas précis).

*Tableau 6 : Les différents substrats utilisés et les produits attendus (en gras le produit essentiellement cherché)*

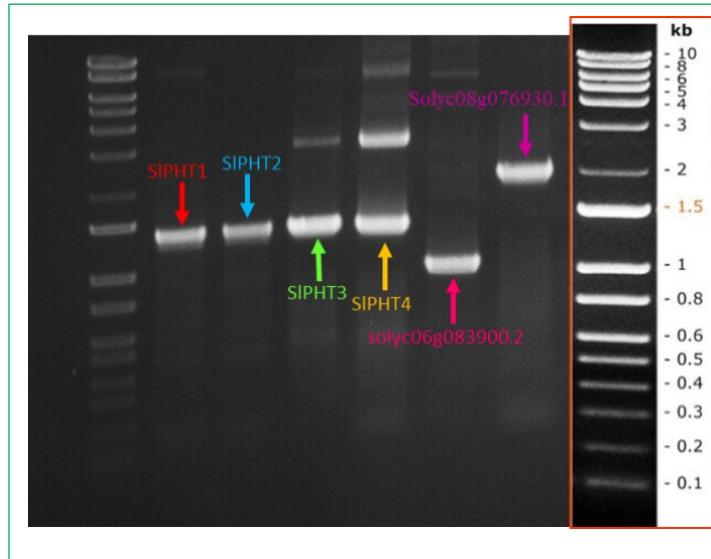
Polyamine et phénolamides	Ester-CoA			
	Dihydrocaféoyl-CoA	Caféoyl-CoA	Feruloyl-CoA	Coumaroyl-CoA
<b>Spermine</b>	Dihydrocaféoyl spermine mono, di, <b>tri</b> ou tétra substitué	Caféoyl spermine mono, di, <b>tri</b> ou tétra substitué	Feruloyl spermine mono, di, <b>tri</b> ou tétra substitué	Coumaroyl spermine mono, di, <b>tri</b> ou tétra substitué
<b>Spermidine</b>	Dihydrocaféoyl spermidine mono, di, <b>tri</b> ou tétra substitué	Caféoyl spermidine mono, di, <b>tri</b> ou tétra substitué	Feruloyl spermidine mono, di, <b>tri</b> ou tétra substitué	Coumaroyl spermidine mono, di, <b>tri</b> ou tétra substitué
<b>Putrescine</b>	Dihydrocaféoyl putrescine	Caféoylputrescine	Feruloylputrescine	Coumaroyl putrescine
<b>Kukoamine A/B</b>	Dihydrocaféoyl spermine <b>tri</b> ou tétra substitué	Mono ou di caféoyl dihydrocaféoyl spermine	Mono ou di feruloyl dihydrocaféoyl spermine	Mono ou di coumaroyl dihydrocaféoyl spermine

## 4.5. Validation des activités *in vivo* des gènes par transformation transitoire des tomates

### 4.5.1. Clonage et construction des vecteurs de surexpression

Afin de créer des lignées de tomate dans lesquelles le niveau d'accumulation des phénolamides est supérieure à celui des plantes non transformées, il faut insérer (grâce à des vecteurs de surexpressions) dans le génome des plantes (d'une manière stable et transmissible entre les générations) plusieurs copies des gènes de biosynthèse ou des gènes qui contrôlent la biosynthèse des phénolamides. De cette manière, les plantes expriment plus ces gènes, ce qui conduit à une augmentation d'accumulation des métabolites ciblés. Le **paragraphe 4.1** explique le choix des gènes ciblés. J'ai cloné le gène solyc06g083900.2 et le gène Solyc08g076930.1 dans le vecteur pGWB2 comme décrit dans le **paragraphe 3.5**. Les gènes *S/PHT1* et *S/PHT2* étaient déjà clonés dans le vecteur pGWB2, alors que les gènes *S/PHT3* et *S/PHT4* étaient dans le vecteur

PCR8. J'ai poursuivi donc, le clonage des *SIPHT3* et *SIPHT4* dans pGWB2 en réalisant une réaction de recombinaison (**Figure 25**).



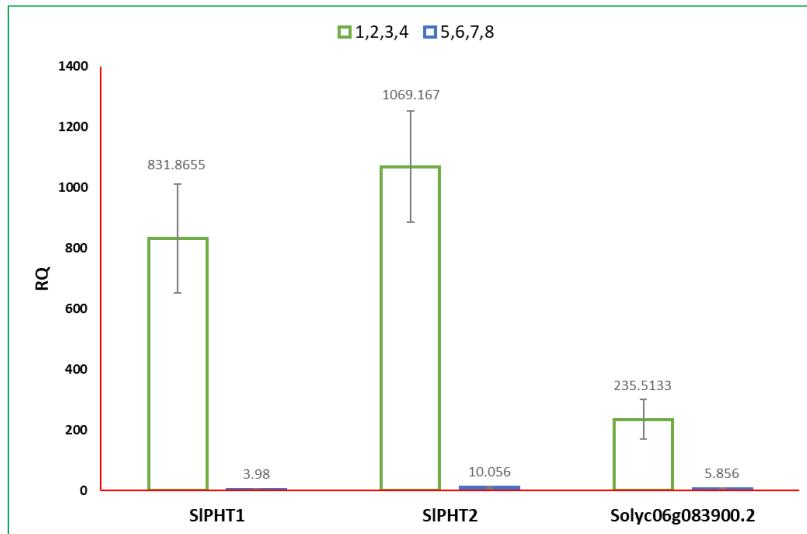
**Figure 25 :** Les constructions de surexpression dans le vecteur pGWB2. Kb : kilobases. Les tailles des gènes sont *SIPHT1* : 1.332kb, *SIPHT2* : 1.332kb, *SIPHT3* : 1.335kb, *SIPHT4* : 1.335kb, *solyc06g083900.2* : 0.837kb, *Solyc08g076930.1* : 2.070kb. Les bandes de plus que 3kb représentent des amplifications aspécifiques du vecteur.

#### 4.5.2. Validation des activités *in vivo* des gènes par transformation transitoire des tomates

Après avoir construit les vecteurs de surexpressions, j'ai effectué des transformations transitoires avec ces constructions pour valider leur fonctionnalité et valider *in vivo* le rôle des gènes ciblés. J'ai commencé par les constructions qui permettent de surexprimer le gène *SIPHT1*, *SIPHT2* et *solyc06g083900.2*. Ainsi, la surexpression de ces gènes après la transformation transitoire des plantes sera un indice de la validité du système.

J'ai réalisé l'expression transitoire sur 4 plantes par construction et je l'ai comparé à 4 plantes témoins transformées avec le vecteur vide. Après 4 jours de transformation, J'ai récolté les feuilles puis je les ai broyées pour en extraire les composés phénoliques et l'ARNm en vue d'analyses d'expression de gène en qPCR. Les données de qPCR ont bien montré une surexpression des gènes au bout de 4 jours pour les différentes constructions en les comparant avec le niveau d'expression de ces mêmes gènes dans les plantes témoins (**Figure 26**). Les RQ moyens des plantes surexprimant *SIPHT1*, *SIPHT2* et *Solyc06g083900* sont respectivement 208 fois, 100 fois et 40 fois plus élevés que les RQ moyen calculés sur les plantes non transformées (**Figure 26**). Les résultats des qPCR confirment la validité des constructions réalisées, ce qui me permettra d'utiliser ces constructions dans la suite de mes travaux de thèse, notamment la transformation stable. J'ai regardé en plus dans les feuilles qui surexpriment *solyc06g083900.2* le niveau

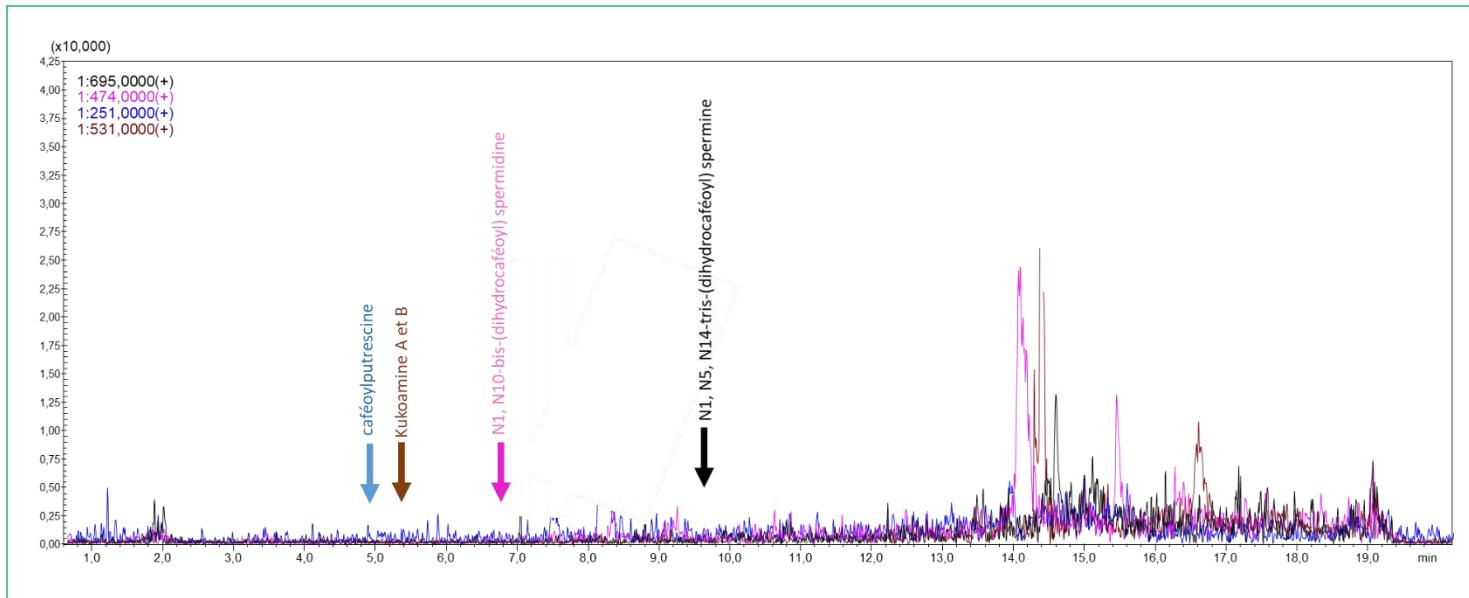
d'expression des gènes *SIPHT1* et *SIPHT2*. Les résultats de qPCR n'ont cependant montré aucune surexpression de ces deux gènes dans les feuilles des plantes qui surexpriment *solyc06g083900.2* par rapport aux feuilles témoins.



**Figure 26 :** Les moyennes des RQ du niveau d'expression des gènes *SIPHT1*, *SIPHT2* et *solyc06g083900.2* dans les plantes transformées avec les constructions de surexpression (en vert) et les plantes transformées avec le vecteur vide (en bleu).  $P < 0.05$  (p value). 1,2,3,4 : plantes transformées avec le vecteur de surexpression. 5,6,7,8 : plantes transformées avec le vecteur vide. le ratio d'expression (Relative quantification-RQ) représente le niveau d'expression du gène ciblé par rapport à un calibrateur<sup>4</sup>.

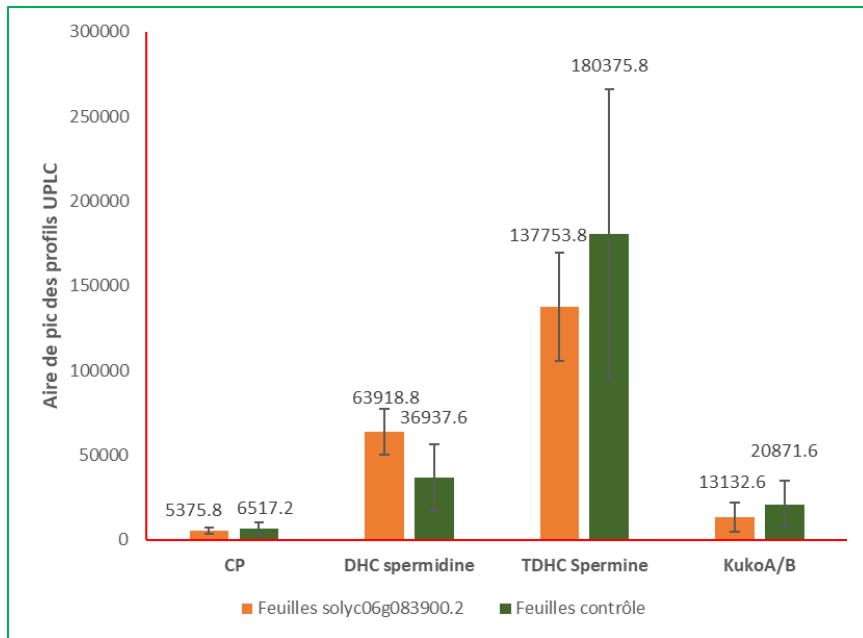
Sur ces mêmes échantillons, nous avons analysé l'accumulation en phénolamides dans les feuilles et les tiges, en suivant spécifiquement les accumulations de caféoylputrescine (CP), de Kukoamine A et B (kukA/B), de N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine (DHC spermidine) et de N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine (TDHC spermine). Dans le cas des plantes surexprimant *SIPHT1* et *SIPHT2* étonnamment, aucun de ces métabolites n'a pu être détecté dans les plantes (feuilles et tiges) transformées ni dans les plantes témoins (**Figure 27**).

<sup>4</sup> Un échantillon témoin dans lequel le niveau d'expression du gène sera considéré référence pour comparer, par rapport à lui, le niveau d'expression du gène dans les autres échantillons. Le RQ du calibrateur a la valeur arbitraire de 1. Une valeur de 10 signifie une expression du gène dix fois plus que celle du calibrateur et au contraire une valeur de 0,1 signifie une expression dix fois moindre que celle calibrateur.

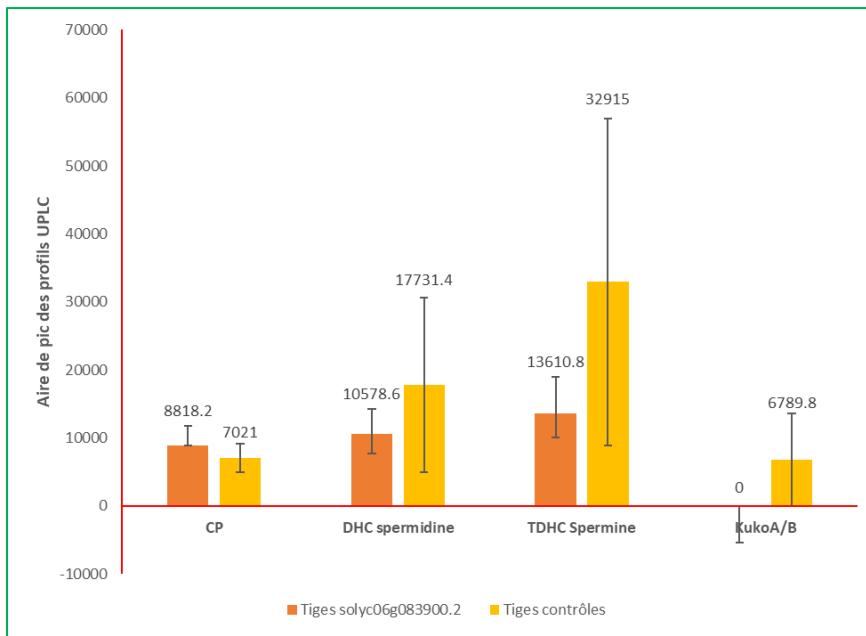


**Figure 27 :** Profil des chromatogrammes UPLC-MS en analyse SIM sur un échantillon de feuille transformé transitoirement avec *SLPHT1*. En couleur la place des pics attendus pour chaque molécule. L'ion 251(+) permet de détecter deux isomères de la caféoylputrescine, l'ion 531 (+) permet de détecter les isomères Kukoamine A et B, l'ion 474 (+) permet de détecter le N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine et l'ion 695 (+) permet de détecter le N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine.

Les analyses UPLC des échantillons qui surexpriment le gène *solyc06g083900.2* n'ont pas montré d'effet significatif sur l'accumulation de CP ni des autres phénolamides ciblées par rapport aux plantes témoins, que ce soit dans les feuilles (**Figure 28**) ou dans les tiges (**Figure 29**).



**Figure 28 :** Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les feuilles des plantes qui surexpriment *solyc06g083900.2* (en orange) en comparaison avec celles dans les feuilles des plantes contrôles transformées avec le vecteur de surexpression vide (en vert). CP : Cafénylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocafényl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocafényl) spermine. KukoA/B : Kukoamine A et B.  $p > 0.05$  (p value)



**Figure 29 :** Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les tiges des plantes qui surexpriment *solyc06g083900.2* (en orange) en comparaison avec celles dans les tiges des plantes contrôles transformées avec le vecteur de surexpression vide (en jaune). CP : Cafénylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocafényl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocafényl) spermine. KukoA/B : Kukoamine A et B.  $p > 0.05$  (p value)

D'après les résultats de qPCR, les enzymes codées par *SlPHT1* et *SlPHT2* et le facteur de transcription codé par *solyc06g083900.2* sont bien surexprimés dans les plantes. Cependant, leur

expression ne se traduit pas par une modification de l'accumulation de phénolamides dans les tissus comme attendue. Ceci est d'autant plus étonnant que la fonction des *SIPHT1* et *SIPHT2* a été caractérisée *in vitro*. Nous avons écarté l'hypothèse d'erreur dans la séquence des gènes en procédant une nouvelle fois à un séquençage des plasmides portés par les agrobactéries. Nous avons formulé plusieurs hypothèses pouvant mener à ce résultat. La première est qu'un délai trop court entre l'agro-infiltration et la récolte des plantes n'a pas permis d'observer une accumulation significativement plus importante de phénolamides. La deuxième est que l'absence d'accumulation est liée à un manque de substrat dans les plantes. Le caféoyl-coA et la putrescine sont deux métabolites impliqués dans plusieurs autres voies de biosynthèses. Leur disponibilité pourrait ainsi être limitante. Nous avons mis en place des expérimentations spécifiques destinées à tester ces hypothèses.

#### **4.6. L'accumulation des phénolamides dans la plante nécessite-t-elle plus de 4 jours pour être observable ? Etude cinétique de la corrélation entre la surexpression de *SIPHT1* et l'accumulation de caféoylputrescine**

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des transformations transitoires de 24 plantes de tomates âgées de 20 jours. Douze de ces plantes sont transformées avec pGWB2+*SIPHT1* et 12 autres avec le vecteur pGWB2 vide comme témoins. Nous avons réalisé 4 échantillonnages, après 4, 6, 8 et 11 jours de transformation. A chaque fois, nous avons utilisé 3 plantes pGWB2+*SIPHT1* et 3 plantes pGWB2 vide, que nous avons rincées avec de l'eau distillée et dont j'ai extrait l'ARN et les composés phénoliques. Le RQ est calculé à chaque fois par rapport à une plante témoin récoltée le même jour que les autres plantes. Les analyses des données qPCR ont bien montré une surexpression du gène *SIPHT1* au bout de 4 jours de transformation et qui se maintient jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour, avec une légère augmentation au 6<sup>ème</sup> puis 8<sup>ème</sup> jour (**Figure 30**). Cependant, aucune accumulation de CP ni d'autre phénolamides dans ces plantes n'est détectée, même pour les plantes témoins. Même à 11 jours de surexpression du gène *SIPHT1*, les plantes ne sont donc pas capables de suraccumuler la molécule CP ni d'autres phénolamides.

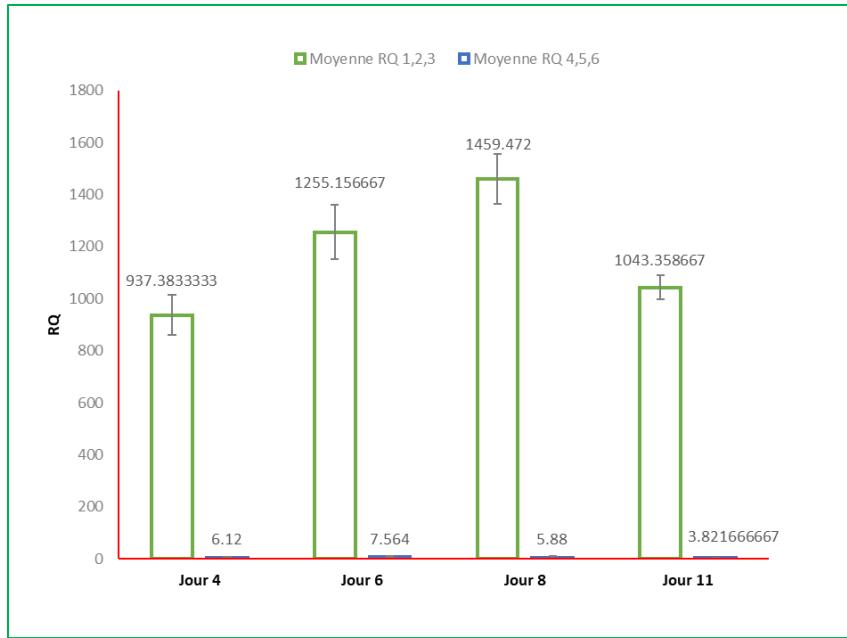


Figure 30 : Moyennes des RQ du niveau d'expression du gène SLPHT1 dans les plantes qui surexpriment SLPHT1 (1,2,3) par rapport aux plantes contrôles (4,5,6) en fonction du temps.  $P<0.05$

#### 4.7. La quantité de substrats nécessaires à la synthèse de caféoylputrescine dans les plantes est-elle insuffisante ? Influence de l'infiltration des substrats dans les tomates qui surexpriment le gène SLPHT1 sur l'accumulation de caféoylputrescine

Dans le but d'identifier si l'un des substrats nécessaires à la synthèse de CP est limitant pour nos expériences d'expression transitoires, j'ai réalisé l'expérience suivante. Trois plants de tomates âgées de 20 jours sont transformées pour surexprimer le gène SLPHT2 et 3 autres plantes témoins sont transformées avec le vecteur pGWB2 vide. Après 4 jours de transformation, j'ai récolté trois feuilles par plantes et j'ai infiltré les substrats nécessaires à la synthèse de CP, soit de la putrescine (5mM), de l'acide caféïque (5mM) ou les deux combinés en immergeant le pétiole de chaque feuille dans 1.5 mL de solution de substrat, comme décrit dans le **paragraphe 3.7**. L'acide caféïque a été préféré au caféoyl-coA dans la mesure où ce dernier est assez instable. Vingt-quatre heures après l'infiltration des substrats j'ai broyé les feuilles de tomate à l'azote liquide et j'ai extrait les phénolamides.

Les données de l'UPLC pour les feuilles après 4 jours de transformation, n'ont pas montré d'effet significatif sur CP quelle que soit le substrat infiltré (Figure 31). Par ailleurs, nous observons des variations importantes du niveau d'accumulation d'autres phénolamides comme la

TDHCSpermine, mais ces variation apparaissent non significatives en raison d'un variabilité très forte entre échantillons (Figure 31).

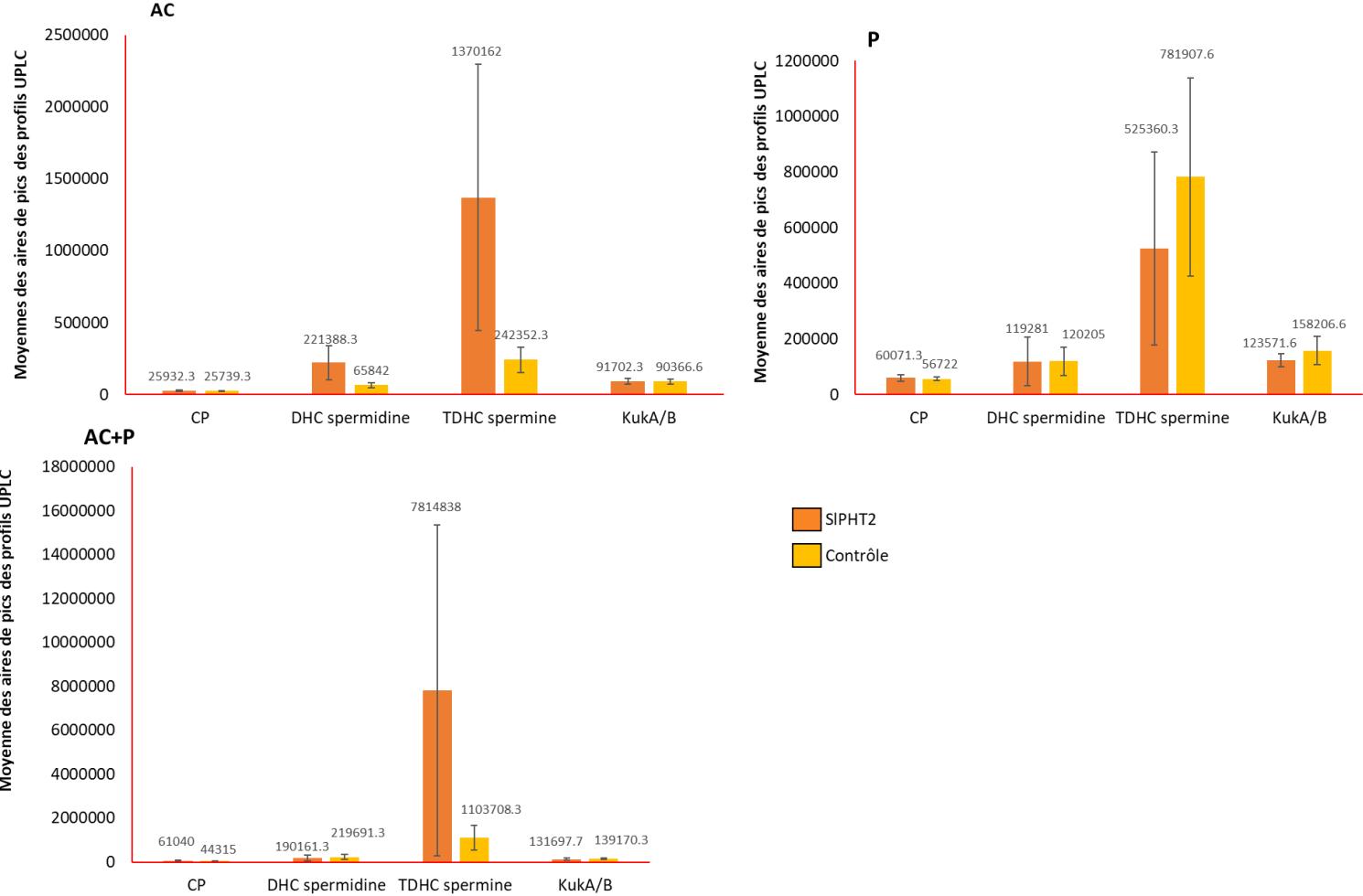


Figure 31 : Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les feuilles des plantes qui surexpriment SIPHT2 après 4 jours de transformation, en comparaison avec celles dans les feuilles des plantes contrôles transformées avec le vecteur de surexpression vide (contrôle) après infiltration avec de l'acide caféïque (AC). CP : Cafénylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. KukA/B : Kukoamine A et B.  $p > 0.05$  (p value).

Les tests d'infiltration ont montré beaucoup de variabilité dans l'accumulation des phénolamides dans les feuilles, la manipulation des feuilles joue certainement un rôle essentiel dans cette variabilité. Cette approche d'infiltration de substrat n'ayant pas donné satisfaction, j'ai tenté une autre stratégie consistant à utiliser *T. absoluta* comme effecteur de la voie des phénolamides.

#### 4.8. L'herbivorie de *T. absoluta* en combinaison avec la surexpression de la *SlPHT1* peut-elle conduire à une suraccumulation de la caféoylputrescine dans les plantes transformées ?

Les travaux réalisés dans la thèse de Victoire Coqueret (2017), ont montré que l'herbivorie de *T. absoluta* entraînent une accumulation de phénolamides dans les tissus de tomate, suggérant une induction générale de cette voie de biosynthèse. L'hypothèse étudiée dans ce paragraphe est que l'utilisation de l'infestation par *T. absoluta* permettra de surmonter le manque des substrats dans les plantes de tomate qui surexpriment *SlPHT1* et ainsi permettre à ces dernières d'accumuler plus de CP. J'ai confirmé les résultats obtenus par V. Coqueret par une étude comparative des teneurs en phénolamides dans les feuilles et tiges de tomates soumises ou non à l'herbivorie de *T. absoluta* (figure en annexe).

Suite à cette analyse préliminaire, j'ai transformé 5 plantes de tomate âgées de 20 jours par le vecteur pGWB2+*SlPHT1* et 5 autres plantes témoins par le vecteur pGWB2 vide. Après 4 jours de transformation, j'ai infesté 3 feuilles de chaque plante par 3 larves de *T. absoluta*. Les phénolamides sont extraits à partir des feuilles locales (FL) où a eu lieu l'herbivorie et des feuilles systémiques (FS) infestées.

De manière générale, les analyses à l'UPLC ont montré une plus forte accumulation de CP que de dérivés spermine quelque soient les plantes (**Figure 32**). Dans les feuilles locales, la surexpression de *SlPHT1* conduit à une augmentation de CP en comparaison des plantes contrôle. La tendance est cependant inversée dans les feuilles systémiques. Les autres phénolamides mesurés ne sont en revanche pas affecté par la surexpression de *SlPHT1* (**Figure 32**). Dans les tiges, la même tendance est observée avec une augmentation de CP dans les tiges locales des plantes surexprimant *SlPHT1* et une diminution dans les tiges systémiques (**Figure 33**).

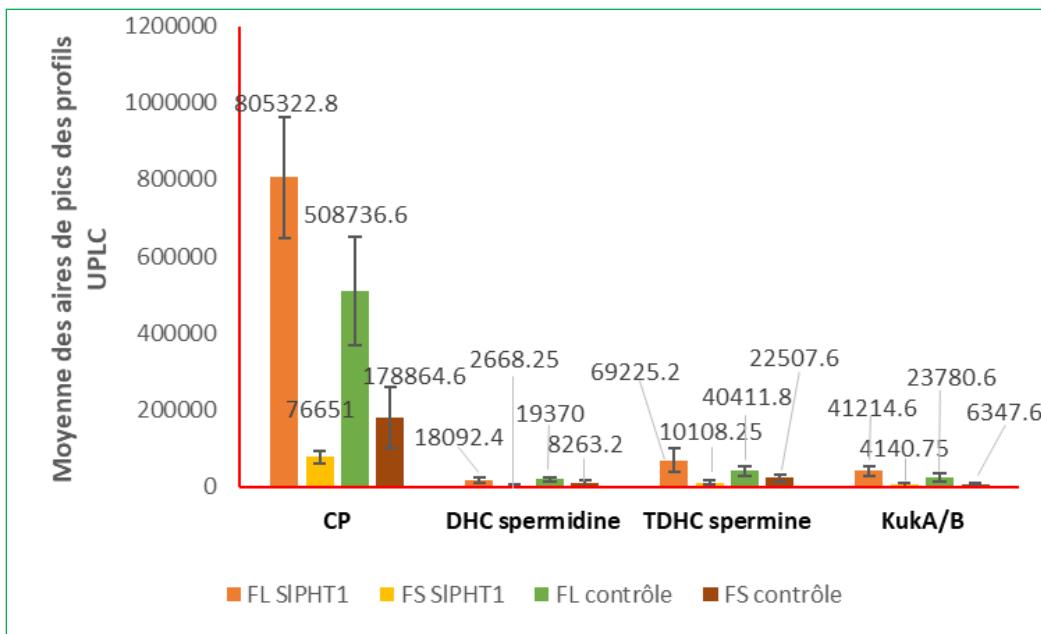


Figure 32 : Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les feuilles locales (FL) et systémiques (FS) des plantes de tomate infestées par *T. absoluta* surexprimant *SIPHT1* (*SIPHT1*) et des plantes transformées avec le vecteur vide infestées (contrôles). CP : Cafénylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. KukoA/B : Kukoamine A et B.  $p>0.05$  ( $p$  value).

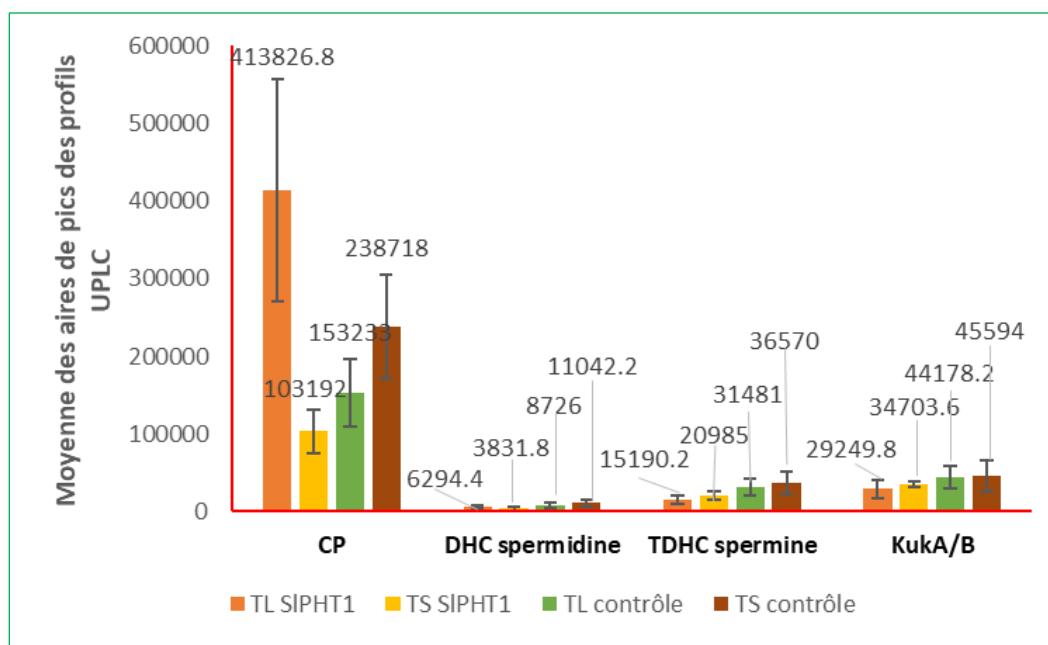


Figure 33 : Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les tiges locales (TL) systémiques (TS) des plantes de tomate infestées par *T. absoluta* surexprimant *SIPHT1* (*SIPHT1*) et des plantes transformées avec le vecteur vide infestées (contrôles). CP : Cafénylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. KukoA/B : Kukoamine A et B.  $p>0.05$  ( $p$ -value).

## 5. Discussions

Les travaux présentés dans ce chapitre avaient pour objectif d'identifier des gènes impliqués dans l'accumulation des phénolamides élicités par l'herbivorie de *T. absoluta* chez la tomate. De plus, j'ai cherché à valider les constructions de surexpression qui me seront utiles pour la création des lignées de tomate modifiées pour l'accumulation en phénolamides.

### 5.1. La transformation transitoire a permis de valider les constructions de surexpression...

En perspective de la construction de lignées stables de tomate dont l'accumulation sera modulée (chapitre 3), j'ai construit les vecteurs d'expression exprimant les différents gènes codant des putrescine hydroxycinnamoyl transférases de tomate (*S/PHT1*, *S/PHT2*, *S/PHT3*, *S/PHT4*) ainsi que l'orthologue de *NaMYB8* (solyc06g083900.2). Afin de vérifier ces constructions, j'ai conduit plusieurs essais d'expression transitoire qui m'ont permis de confirmer que les différentes constructions sont bien surexprimées chez la tomate. La transformation transitoire des tomates a bien montré une surexpression des gènes *S/PHT1*, *S/PHT2*, et solyc06g083900.2 par analyse des échantillons par qPCR après 4 jours d'agroinfiltration. Puisque les échantillons d'ARNm sont traités par une DNase capable de dégrader toute contamination d'ADN (provenant des agrobactéries) avant la synthèse de leur ADNc convenable, la surexpression est donc due à l'insertion des gènes sous l'effet du promoteur 35S dans le génome des plantes.

### 5.2. ...mais n'a pas permis de valider clairement le rôle de ces gènes *in vivo*

Parallèlement à la validation des constructions à travers la transformation transitoire, je cherchais aussi à valider le rôle des gènes *in vivo* dans l'accumulation des phénolamides, notamment les gènes *S/PHT* qui peuvent être considérés comme des contrôles positifs, puisque les tests d'activité enzymatiques *in vitro* ont confirmé leur activité de synthèse de CP. Au contraire de la surexpression des gènes, la CP n'est pas accumulée dans les tomates transformées transitoirement. Les chromatogrammes des analyses à l'UPLC n'ont montré aucune accumulation de phénolamides dans les plantes transformées avec les gènes *S/PHT1*, *S/PHT2* et celles transformées avec le vecteur vide. La surexpression de solyc06g083900.2 n'a montré aussi aucune accumulation significative de phénolamides. Sachant que normalement CP est présente en faible quantité dans les tomates saines, cela pose la question de l'impact des conditions de cultures. L'expérience de transformation par *S/PHT1/2* et celle de solyc06g083900.2 n'ont pas été réalisé en même temps. Ainsi il existe une différence dans les conditions de cultures notamment l'intensité lumineuse du jour. Toutes les plantes utilisées ont été cultivées dans une petite serre chauffée mais

les plantes utilisées pour la transformation de *S/PHT1/2* ont été cultivé en automne alors que celles pour la transformation de *solyc06g083900.2* en fin de printemps sans aucun supplément de lumière autre que la lumière du jour normale. Cela peut expliquer l'absence des phénolamides même dans les plantes témoins de la transformation avec *S/PHT1/S/PHT2*.

L'absence d'accumulation des phénolamides dans les plantes qui surexpriment transitoirement les *S/PHT* m'a amenée à tester plusieurs hypothèses. Ma première hypothèse était que le temps d'incubation de 4 jours suite à l'agro-infiltration était trop court pour voir une conséquence de l'expression de *S/PHT1/2* sur l'accumulation de métabolites. L'étude cinétique que j'ai conduite a permis de montrer que même 11 jours après l'agro-infiltration et en dépit d'un niveau d'expression des gènes *S/PHT1/2* maintenu élevé, aucune accumulation de phénolamide n'est observée. J'ai supposé ensuite que l'absence d'effet sur l'accumulation en phénolamides pouvait résulter d'une limitation de la disponibilité en substrat. Pour cela, j'ai tenté d'infiltre les substrats dans les feuilles ou bien de stimuler l'ensemble de la voie de biosynthèse des phénolamides en soumettant les plantes agro-infiltrées à l'herbivorie par des larves de *T. absoluta*. Les résultats ont montré que même en ajoutant les substrats, les plantes qui surexpriment *S/PHT* après 4 jours de transformation, n'accumulent pas significativement plus de phénolamides.

Cependant, en combinant la surexpression de *S/PHT1* à l'herbivorie de *T. absoluta*, il en résulte une accumulation plus importante de CP dans les feuilles et les tiges proches du site infesté par rapport aux témoins. Cette différence, significative, demanderait à être confirmée sur un plus grand nombre d'échantillons, mais elle peut être interprétée comme une conséquence de la surexpression des *S/PHT*. Cette accumulation apparaît néanmoins assez faible au regard du niveau de surexpression du transgène. Une interprétation est que la quantité des précurseurs de synthèse de CP (caféoyl-coA et putrescine) demeure limitante dans la plante même lorsqu'elle est soumise à l'herbivorie de *T. absoluta*. Dans ces conditions, l'ensemble de la voie est supposé être induit, mais le niveau d'expression des PHT endogènes l'est aussi (*S/PHT1* et *S/PHT2* d'après les données de la banque RNAseq) ce qui pourrait masquer l'effet de la surexpression des transgènes. La diminution de CP dans les tissus systémiques, plus éloigné du site d'herbivorie, pourrait être la conséquence d'allocation des substrats au site d'herbivorie ce qui pourrait illustrer le caractère limitant de la disponibilité en substrat.

### 5.3. L'absence de l'accumulation de phénolamide pourrait-elle être dûe à une mauvaise expression des protéines ?

L'absence d'accumulation en phénolamides dans les plantes transformées pourrait aussi être lié à une faible accumulation des enzymes codées par les transgènes. Nous avons utilisé le suppresseur P19 dans les transformations transitoires pour surmonter tout effet de dégradation des protéines codées par les gènes ciblés dans la cellule. Ce suppresseur est utilisé avec succès dans la littérature et notamment chez les Solanacées comme les plantes du genre *Nicotiana*. Cependant, dans leur étude sur l'optimisation de la transformation transitoire chez la tomate, la laitue et *Arabidopsis*, Wroblewski et al. (2005) ont trouvé que la transformation transitoire par agroinfiltration présente certaines limites reliées aux espèces, à la compatibilité biologique des tissus infiltrés et à l'accessibilité de ces tissus à *A. tumefaciens*. De plus, ils ont conclu que l'efficacité des expressions transitoires est influencée par des variables expérimentales qui affectent la virulence d'*A. tumefaciens* et l'état physiologique de la plante (Wroblewski et al., 2005). Dans la littérature, l'expression transitoire des protéines dans les tomates présente parfois des difficultés et génère de faibles niveaux d'expression des protéines (Hoshikawa et al., 2019). Les causes de ces difficultés ne sont pas clairement identifiées. Les phytohormones endogènes induits par l'agroinfiltration pourraient jouer un rôle (Lee et al., 2009). La présence des agrobactéries induit l'accumulation de phytohormones et notamment la synthèse d'acide salicylique (SA) dans les tissus agroinfiltrés présentant un effet antagoniste à l'acide jasmonique (JA) (Lee et al., 2009).

Pour confirmer le niveau d'accumulation des protéines dans les plantes transformées et éventuellement l'optimiser, je suggère plusieurs pistes d'amélioration. La première consiste à utiliser des constructions fusionnées au gène GFP (Green Fluorescent Protein). Ce système permettra en premier lieu de valider la synthèse de la protéine et, en plus, de localiser où se trouve la protéine dans la cellule. Ces informations permettront peut-être de savoir si le problème vient de la synthèse de la protéine ou bien de sa translocation et expression dans la cellule. S'il s'avère que le système d'expression est en cause dans l'obtention de quantité d'enzyme suffisante, je suggère d'essayer d'autres systèmes comme, par exemple, le système « Tsukuba » (Yamamoto et al., 2018). Ce système d'expression transitoire des protéines dans les plantes a montré une efficacité de rendement qui atteint 4 mg de protéine par g de matière fraîche chez *Nicotiana benthamiana* (Yamamoto et al., 2018; Suzaki et al., 2019). Il a été appliqué avec efficacité dans les feuilles et les fruits de plusieurs variétés de tomate (Micro-Tom, Moneymaker, Aichifirst, *Ailsa Craig*, M82, Rutgers, Ponderosa, Ueleie 106 WP, et des espèces sauvages *S. pennellii* et *S. pimpinellifolium*)

(Hoshikawa et al., 2019). Le système « Tsukuba » se base sur l'utilisation du vecteur binaire pBYR2HS pour la transformation des plantes. Ce vecteur a l'avantage de la réPLICATION circulaire (Rolling circle) dans les cellules végétales ; il n'a pas besoin de la présence d'un supresseur de silencing et il contient un double terminateur composé des deux terminateurs HSP (Heat Shock Protein) et Ext (extensine) qui augmentent le rendement de la surexpression (Yamamoto et al., 2018).

Enfin, une autre alternative à l'expression transitoire pour étudier le rôle *in vivo* de gènes ciblé, consiste à développer une approche de VIGS (virus induced gene silencing). Cette technique nous permettra d'éteindre transitoirement les gènes ciblés et regarder l'impact sur l'accumulation en phénolamides. Cette technique permet par ailleurs de contourner le problème potentiel de la disponibilité en substrat dans la plante, lié à la surexpression transitoire. La technique VIGS est utilisée avec efficacité sur le tabac et la tomate (Liu et al., 2002; Velásquez et al., 2009; Onkokesung et al., 2012). Nous pouvons prévoir de réalier les constructions convenables pour les gènes *SIPHT* ainsi que *solyc06g083900.2* et procéder à l'application sur les tomates.

#### **5.4. Identification de huit gènes candidats codant pour une spermine/spermidine acyltransférase mais pas de confirmation d'activité**

Une partie de mon travail a porté sur l'identification de gènes codant des transférases possiblement impliquées dans la synthèse des dérivés spermidine et spermine s'accumulant dans les feuilles de tomates soumises à l'herbivorie de *T. absoluta*. L'intérêt de l'identification des enzymes est d'avoir la possibilité de cibler spécifiquement la modulation du niveau d'accumulation des dérivés spermidine/spermine par des lignées génétiquement modifiées. En m'appuyant sur les données des banques RNAseq à ma disposition (feuilles de tomate soumises ou non à l'herbivorie) et en m'appuyant sur le fait que les PHT contrôlant l'accumulation de CP sont très fortement induits (*SIPHT2*, gène le plus induit, *SIPHT1* dans le top100), ma stratégie a été de rechercher des candidats annotés comme acyltransférase (« HXXXD-type acyl-transferase family protein ») et fortement induits (top 250 des gènes induits par l'herbivorie). Cette recherche m'a conduite à identifier 8 gènes candidats (*Solyc07g008390.1.1* ou *SHT1*, *Solyc02g093180.2.1* ou *SHT2*, *Solyc05g015800.2.1* ou *SHT3*, *Solyc07g008380.1.1* ou *SHT4*, *Solyc12g005430.1.1* ou *SHT5*, *Solyc03g117600.2.1* ou *SHT6*, *Solyc12g096770.1.1* ou *SHT7*, et *Solyc12g010980.1.1* ou *SHT8*). Parmi les 8 candidats, 7 sont encore sans fonction associée, alors que *SHT6* a été identifiée comme une hydroxycinnamoyltransférase (HCT) catalysant la formation d'acide chlorogénique à partir de caféoyl-coA et de quinate. L'expression hétérologue des 7 candidats dans *E. coli* (BL21-DE3) et

les tests d'activité enzymatiques conduits sur les extraits bruts bactériens et les enzymes purifiées en présence de spermine/spermidine et de 4 dérivés CoA (dihydrocaféoyl-, caféoyl, féruloyl, *p*-coumaroyl-) n'ont pas permis d'identifier de fonction *in vitro*.

L'analyse en SDS-PAGE des extraits bruts et des protéines purifiées a clairement montré une expression détectable des enzymes SHT1, SHT4 et SHT8. Au regard des résultats des tests d'activité *in vitro*, cela amène à conclure que ces enzymes ne catalysent pas d'activité spermine/spermidine acyltransférase. En revanche, l'expression de SHT2, SHT3, SHT5 et SHT7 n'a pas été clairement démontrée par SDS-PAGE ce qui laisse la possibilité que l'absence d'activité *in vitro* est liée à une mauvaise expression des protéines. La technique SDS-PAGE n'est vraisemblablement pas assez sensible comme le démontre l'utilisation du contrôle positif *SIPHT3* pour lequel aucune expression n'est détectée sur gel mais a toutefois une activité de synthèse de CP. Une analyse en western-blot, en utilisant des anticorps anti-His permettrait peut-être de détecter l'expression de ces enzymes. Cependant, si le système d'expression utilisé n'apparaît pas optimal pour ces gènes candidats, d'autres alternatives sont possibles. Plusieurs vecteurs d'expression dans des systèmes bactériens existent en plus du pET-28 et certains sont optimisés pour l'expression de protéines (pMAL, pCOLD et pOGWA). Une autre alternative est d'utiliser un autre système d'expression hétérologue comme la levure. Récemment, plusieurs études ont montré la synthèse de phénolamides dans des levures, en les transformant avec les enzymes de biosynthèse et en ajoutant les substrats dans le milieu de culture (Eudes et al., 2011, 2016; Li et al., 2016; Perrin et al., 2021). Ces travaux s'appuient sur le fait que les levures contiennent naturellement les voies de biosynthèse des polyamines (spermine, spermidine...), alors il suffit de transformer les levures avec l'enzyme 4CL et l'enzyme N-hydroxycinnamoyltransférase ciblée (Perrin et al., 2021). La 4CL permet la synthèse des esters -CoA à partir des acides hydroxycinnamiques, et la N-hydroxycinnamoyltransférase catalyse l'association des ester-CoA à des polyamines (Perrin et al., 2021). En cas d'absence du précurseur acide hydroxycinnamique désiré chez les levures, ce dernier peut être ajouter dans le milieu de culture (Perrin et al., 2021).

En attendant de pouvoir confirmer la bonne expression de leur enzyme, les gènes SHT2, 3, 5 et 7 demeurent encore de bons candidats à tester. Bien que sa séquence soit assez éloignée de celles de spermine acyltransférase de solanacée (**Tableau 5**), SHT2 est exprimée exclusivement dans les tissus soumis à l'infestation de *T. absoluta*. SHT5 voit son expression multipliée par 10X suite à l'herbivorie. Par ailleurs, l'analyse d'autres bases de données d'expression (TEA, Tomato Expression Atlas ; TED, Tomato Expression Database) indiquent que ce gène est exprimé

essentiellement dans les jeunes feuilles et est induit aussi par une infection bactérienne (*P. syringae*). D'après ces mêmes sources, SHT7 est exprimé dans les feuilles jeunes et mature et est aussi induit par l'infection bactérienne. Par ailleurs, SHT7 présente une identité protéique de l'ordre de 50% avec les deux enzymes *Sm/SrSpmHT* identifiées chez l'aubergine et la morelle de balbis comme spermine acyltransférase. Néanmoins, sur la base de cette comparaison, le candidat le plus proche était SHT8 qui présente de l'ordre de 70% d'identité protéique avec ces deux enzymes. Mais nous n'avons pas pu confirmer d'activité spermine acyltransférase pour cette enzyme. SHT7 représente le candidat le plus proche de CV86 de l'ordre de 60% d'identité protéique. CV86 n'a pas été clairement caractérisé, mais il est supposé jouer un rôle sur des spermidines monoacylés (Onkokesung et al., 2012). L'hypothèse d'un rôle de certaines SHT sur des dérivés spermine et spermidine n'est pas à exclure et n'a malheureusement pas pu être testée faute de substrat. Seuls des essais ont été conduits en utilisant comme substrat la kukoamine A, une spermine diacylé, mais sans succès.

L'absence d'identification de spermine acyltransférase parmi les candidats identifiés peut amener à formuler de nouvelles hypothèses sur la nature de l'enzyme portant cette activité. Une première hypothèse est que cette activité est portée par les *SiPHT* préalablement identifiées. Des mesures d'activité *in vitro* faites sur ces enzymes en présence de spermine ou de spermidine n'ont pas permis de révéler ce type d'activité, que ce soit au pH classiquement utilisé pour ces activités (pH 9) ou à des pH plus acides (pH 4) ou plus basiques (pH 11). Une seconde hypothèse est que cette activité n'est pas portée par une acyltransférase, mais par une autre classe d'enzyme. Récemment, chez la tomate, une enzyme appartenant aux polycétides synthases, la chalcone synthase (*SiCHT*) a montré une activité de synthèse de phénolamides dérivés d'anthranilate. À la base cette enzyme est responsable de la création de liaison de condensation C-C pour la synthèse des flavonoïdes (Austin and Noel, 2003; Dibyendu, 2015). Récemment, *SiCHT* a montré une affinité pour la création de liaisons C-N entre l'ester *p*-coumaroyl-CoA et l'hydroxyanthranilate pour former le phénolamide *p*-coumaroyl hydroxyanthranilate, dans les levures (Kong et al., 2020). Cette enzyme a été aussi décrite chez *Arabidopsis* pour sa capacité à synthétiser des avenanthramides (Kong et al., 2020). Cependant, la recherche d'enzymes annotées « polycétide synthase/chalcone synthase » dans la base RNAseq de tomate ne m'a pas permis d'identifier de candidats supplémentaires. Une troisième famille enzymatique pourrait être intéressante. Il s'agit de la famille des GDSL lipases. Chez la tomate, l'enzyme *SiCGT* (glucarate caféoyltransférase) a une activité acyltransférase. En effet cette enzyme permet la synthèse du caféoylglucarate à partir

de la caféoylquinate chez la tomate (Teutschbein et al., 2010). Cela peut laisser supposer un rôle de cette famille d'enzyme dans le transfert des ester CoA, notamment la caféoyl-CoA vers divers accepteurs. L'analyse de la banque ARN seq a permis d'obtenir 3 candidats, Solyc02g071720, Solyc12g017460 et Solyc03g006250, identifiés comme GDSL et qui apparaissent parmi les 250 premiers gènes exprimés par l'herbivorie (respectivement rang 180, rang 184 et rang 205). Aucun de ces gènes n'a été caractérisé jusqu'à maintenant.

En conclusion, les travaux de ce chapitre m'ont permis de valider les constructions de surexpression que je vais utiliser dans la suite des travaux de transgénèse. Le gène *SIPHT1/2* a montré un rôle dans l'accumulation de la CP *in vivo* mais ce résultat nécessitera confirmation avec un plus grand nombre de répétitions. Le travail d'identification d'enzyme portant la fonction spermine acyltransférase à amener à sélectionner plusieurs candidats dont l'activité devra encore être confirmée.

## **Chapitre 3 : Création de lignées de tomate génétiquement modifiées pour l'accumulation de phénolamides**

## 1. Préambule

Dans le chapitre précédent, j'ai cherché à identifier des gènes impliqués dans la synthèse de phénolamides chez la tomate. Bien que je n'aie pas trouvé de nouvelles N-acyltransférases impliquées dans la biosynthèse des dérivées spermine et spermidine s'accumulant dans les tissus de tomates soumises à l'herbivorie de *T. absoluta*, j'ai identifié deux facteurs de transcription, solyc06g083900.2 et solyc08g076930.1, représentant des candidats très forts dans la régulation de la voie des phénolamides. Par ailleurs, je disposais de quatre gènes codant des putrescine hydroxycinnamoyl transférase (PHT) impliqué dans l'accumulation de CP.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre a été de construire des lignées de tomates modifiées pour leur capacité de synthèse et d'accumulation de phénolamides. Je me suis centrée sur les 4 gènes de PHT dont une modification pourrait entraîner un effet ciblé sur l'accumulation de CP et le facteur de transcription solyc06g083900.2 (*S/*MYB13) susceptible de contrôler plus largement l'accumulation de phénolamides chez la tomate. J'ai ainsi cherché à créer des lignées de tomate T0 et T1 dont l'accumulation en phénolamides est augmentée ou bien diminuée par le biais d'une approche de surexpression des gènes ciblés dans le premier cas, et de leur extinction par édition génétique (CRISPR/Cas9) dans le second cas. Pour cela, j'ai développé la technique d'édition génétique CRISPR/Cas9 qui, jusqu'alors, n'avait pas été utilisée au LAE.

Avant ma thèse, aucun mode opératoire ou protocole expérimentale de régénération *in vitro* des tomates n'était disponible au sein du laboratoire. C'est pourquoi j'ai appris cette technique lors d'un stage de 1 mois à Bordeaux au laboratoire INRAE Biologie du Fruit et Pathologie (BFP), sous la direction de Pr. Michel Hernould. Grâce à ce stage j'ai pu réaliser les constructions de CRISPR Cas9 et transmettre cette compétence au laboratoire. Le protocole de transformation des cotylédons que j'ai utilisée dans ce chapitre est celui qui est utilisé au laboratoire BFP. J'ai dû adapter et optimiser ce protocole en introduisant des modifications nécessaires selon les produits utilisés et les conditions du laboratoire. Il m'a fallu 2 années parmi lesquelles 6 à 8 mois d'optimisation du protocole de régénération.

L'approche CRISPRcas9 étant encore assez récente, j'ai pris le parti, en guise d'introduction à ce chapitre, de faire un rappel des techniques d'édition de gène. Je présenterai ensuite les travaux réalisés pour la création des transformants et les toutes premières étapes de leur caractérisation.

## 2. Introduction

Les progrès scientifiques des dernières années visent, pour certains d'entre eux, à mieux comprendre les différentes voies de biosynthèse et de régulation des métabolites secondaires afin de pouvoir améliorer leur production dans les plantes ou dans d'autres systèmes hétérologues par des approches de génie génétique (Hain and Grimmig, 2000). Une des méthodes est d'identifier et caractériser le rôle des gènes (gènes codant pour des enzymes de biosynthèse, des facteurs de transcription...) en modifiant leur niveau d'expression. Ainsi, la création de lignées pour lesquelles le niveau d'expression des gènes est modifié, permet d'étudier les impacts de cette modification et en déduire le rôle des gènes.

Cette modification se base sur des approches de transgénèse par l'intermédiaire d'*Agrobactérium tumefaciens*. En effet, *A. tumefaciens* est l'une des rares bactéries capables de délivrer son ADN dans le génome de la plante. Cette bactérie possède un plasmide Ti (Tumor inducing plasmid) qui contient un fragment d'ADN appelé ADN-T (ADN de transfert) codant pour la formation des tumeurs (galle du collet) chez les plantes (Scofield et al., 1996; Canto, 2016). Et c'est grâce au plasmide Ti, que l'agrobactérie est capable de transférer son ADN-T dans le génome de la plante. En se basant sur ce système, les laboratoires ont créé de nombreux systèmes de vecteurs polyvalents portant un gène ou un fragment de séquence souhaité sous le contrôle d'un promoteur eucaryote, plus une séquence de terminaison. Ces vecteurs sont capables de transférer la séquence souhaitée au génome de la plante (Komori et al., 2007). Les études ont permis de sélectionner le CaMV 19S (19S) et le CaMV 35S (35S) comme promoteurs de transcription forts (Rothstein et al., 1987; Driesen et al., 1993). Ces promoteurs sont issus du virus de la mosaïque du chou-fleur et peuvent être utilisés pour différentes familles de plantes (Okumura et al., 2016 ; Odell et al., 1985; Benfey et al., 1990).

Le plant de tomate constitue un matériel biologique modèle pour les travaux de transformations et de régénération *in vitro*. Le premier travail de régénération de tomates à partir de cotylédons et d'hypocotyles date de plus de 30 ans (McCormick et al., 1986). Depuis, des améliorations ont été apportées conduisant à une meilleure efficacité de transformation et des temps de régénération plus courts. (Yasmeen, 2009; Sharma et al., 2009; Trujillo-Moya et al., 2011; Ruf and Bock, 2014; Gupta and Van Eck, 2016; Shikata and Ezura, 2016). L'efficacité de transformation peut être exprimée en pourcentage des explants ayant poussé sur le milieu de sélection (Madhulatha Pantrangi et al., 2007), ou en pourcentage des explants montrant une

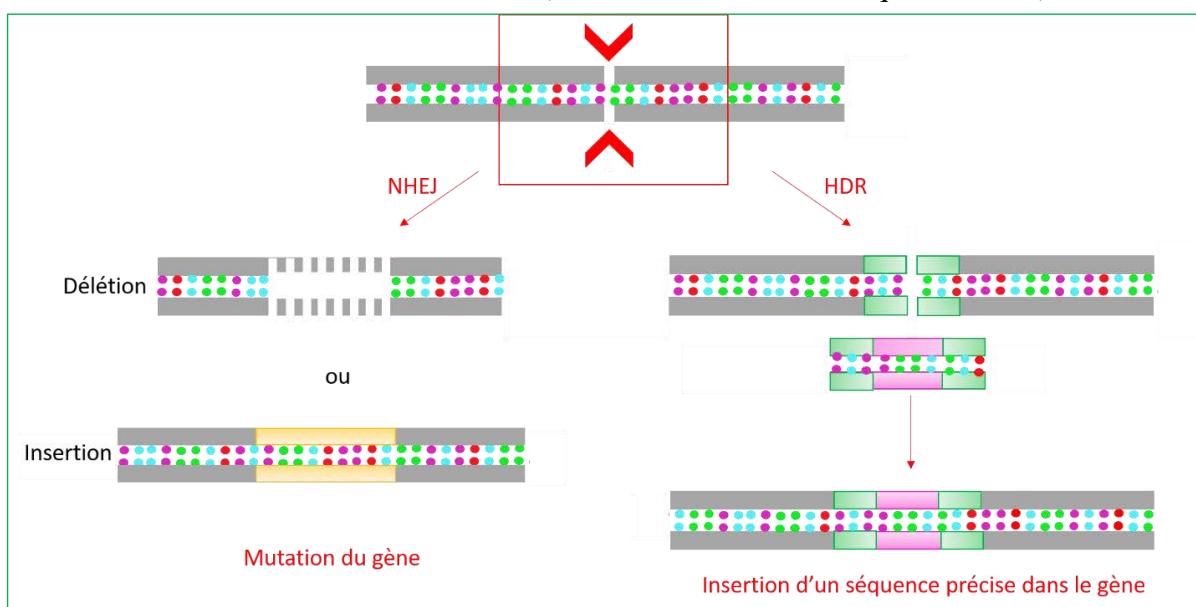
régénération de la partie aérienne sur le milieu de sélection (Patil et al., 2002), ou bien en pourcentage des explants donnant des plantules transgéniques issues des évènements de transformation (Park et al. 2003; Sun et al. 2006). Dans le dernier cas, l'efficacité de production de plantes transgéniques, validée par amplification PCR, peut atteindre 48% (Sun et al., 2006).

Actuellement il existe des nombreux vecteurs commerciaux qui facilitent la construction de vecteurs de surexpression (Lloyd, 2003; Chung et al., 2005; Guo et al., 2018; Van Eck et al., 2019) ou de délétion des gènes (Earley et al. 2006; Li et al. 2015; Yu et al. 2018; D'Ambrosio et al. 2018a; Reem et Van Eck 2019). La surexpression des gènes est utilisée depuis que les premiers protocoles de transformation végétale sont devenus efficaces chez plusieurs familles de plante (Sawa, 2002; Lloyd, 2003; Fu et al., 2007; Liu et al., 2009; Cardoza et al., 2014; Abe and Ichikawa, 2016; Hidalgo-Castellanos et al., 2019; Guo et al., 2019). Elle se base sur l'augmentation du niveau d'expression d'un gène sous le contrôle d'un promoteur de transcription fort (Abdeeva et al., 2012). Le principe est d'insérer dans le génome de la plante un promoteur avec une copie du gène ciblé sous forme d'ADNc (ADN complémentaire) suivi d'un terminateur et d'un gène marqueur (gène de résistance). Ce dernier permettra de sélectionner les plantes qui ont intégré les séquences. La surexpression du gène ciblé permet la transcription de ce gène en grande quantité d'ARNm (ARN messagers) dans la plante. L'augmentation du niveau d'ARNm se traduit par l'augmentation de la quantité de protéine que code ce gène. L'insertion se fait aléatoirement dans le génome par l'intermédiaire d'*A. tumefaciens* (Scofield et al., 1996; Bendahmane et al., 2000).

La délétion de gène est réalisable par des stratégies d'extinction telles que l'antisens (Atanassova et al., 1995; Sun et al., 2005), la co-suppression (Zhong et al., 1998; Martínez de Alba et al., 2013), ainsi que des stratégies d'édition génétique (knock out) telles que les méga-nucléases (MNs), les nucléases à doigt de Zinc (ZFNs), les nucléases effecteur types TAL (TALENs) et la technique CRISPR/Cas9, la plus récente (type II clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9) (Mao et al., 2019). L'édition génétique consiste à créer des modifications localisées et très spécifiques dans les séquences génomiques. En général elle repose sur des enzymes, dites nucléases, spécifiques des séquences du gène ciblé appelées SSN. Ces enzymes forment des ciseaux moléculaires du génome et génèrent des cassures du double brin d'ADN (Double-strand breaks ; DSB) à des sites précis des gènes ciblés (Belhaj et al., 2015). La cellule essaie de réparer les DSB générés par deux mécanismes de réparation endogènes qui sont la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) ou la réparation dirigée par homologie (HDR) (Voytas, 2013) (**Figure 34**). NHEJ introduit des suppressions ou des insertions au niveau

du site de rupture puis l'ADN ligase rejoint les extrémités séparées (Voytas, 2013; Belhaj et al., 2015). Cette réparation imparfaite conduit à une mutation du gène. La HDR utilise des amorces pour la réparation des ruptures (Belhaj et al., 2015). Ainsi la réparation est parfaite et homologue aux amorces introduites dans la cellule (Shukla et al., 2009; Belhaj et al., 2015) (**Figure 34**).

La découverte du rôle des nucléases SSN dans l'insertion d'ADN exogène par recombinaison homologue (HR) a permis de caractériser la fonction de plusieurs gènes chez les souris, hamsters, levures, plantes (Capecci, 1989; Puchta et al., 1993). Mais l'insertion de l'ADN se faisait à des sites aléatoires et à une faible fréquence, ce qui a conduit à rechercher un autre outil plus performant. Ainsi, l'utilisation des méga-nucléases (MNs) comme premiers outils d'édition génétique a émergé (Rudin et al., 1989). Les MNs ont la particularité de reconnaître des longues séquences d'ADN (12 à 40 paires de bases), ce qui rend difficile le ciblage d'une séquence d'intérêt (Jeggo, 1998). De plus, la construction artificielle de l'ensemble des MNs est difficile, ce qui restreint l'utilisation à des MNs naturelles (Prieto et al., 2007; Razzaq et al., 2019).



**Figure 34 :** mécanisme de réparation des DSB. La cellule répare les DSB générés par deux mécanismes, la jonction des extrémités non homologues (NHEJ) ou la réparation dirigée par homologie (HDR). NHEJ introduit des délétions ou des insertions au niveau du site de rupture. Cette réparation imparfaite conduit à une mutation ou même un dysfonctionnement du gène. La HDR utilise des amorces exogènes pour la réparation des ruptures. Ainsi la réparation est parfaite et homologue aux amorces, ce qui permet une insertion d'une séquence désirée bien précise dans le gène.

En 1996, Kim et al. ont découvert les nucléases ZFNs (Zinc Finger Nucleases) mais ce n'est qu'en 2003 que les scientifiques ont pu inactiver des gènes en utilisant les ZFNs comme outils d'édition génétique programmables (Kim et al., 1996; Bibikova et al., 2003). Les ZFNs sont des enzymes de restriction artificielles comportant 2 domaines. Le premier domaine est responsable de la liaison avec l'ADN et peut rassembler de 3 à 6 doigts de Zinc, alors que le deuxième est celui

du clivage de l'ADN qui se base sur l'activité de l'enzyme FokI (Flavobacterium okeanokoites endonuclease I) (Bibikova et al., 2003). Les ZFNs sont capables de reconnaître une petite séquence de 9 à 18 pb. Leur utilisation a permis d'augmenter la spécificité de ciblage et la fréquence du HR (Gupta et al., 2012).

Plus tard, l'outil TALENs a été inclus parmi les outils d'édition génétique (Boch et al., 2009; Cermak et al., 2011). Il est composé des facteurs de transcription TALE et du domaine de clivage de l'endonucléase Fok I (Boch et al., 2009). Les facteurs de transcription TALE sont capables de rentrer dans le noyau et reconnaître un nucléotide spécifique dans la séquence ciblée où Fok I va couper (Cermak et al., 2011).

L'utilisation des outils MNs, ZFNs et TALENs implique des protocoles longs et complexes pour atteindre une bonne spécificité de la séquence ciblée. En 2013, l'outil CRISPR/Cas détrône les précédents par une application simple, rapide et accompagnée d'une grande reproductibilité et efficacité (Cong et al., 2013; Razzaq et al., 2019).

*Tableau 7 : Comparaison entre les différents outils d'édition génétique.*

Techniques d'édition génétique				
	Méga nucléases	ZFN	TALEN	CRISPR-Cas
Composants du complexe	Plusieurs méga nucléases	ZFN-FokI	TALEN-FokI	<b>CRISPR-Cas</b>
Liaison entre ADN et Complexe	Protéine-ADN	Protéine-ADN	Protéine-ADN	<b>ARN-ADN</b>
La cible d'ADN	Une séquence/méga nucléase	3 pb/ZFN	1 pb/TALEN	<b>Séquence adjacente au PAM</b>
Inconvénients	*Aspécifique *Difficile de synthétiser des complexes différents des naturels *Limitation d'utilisation	*Deux complexes nécessaires pour que FokI s'homodimériser *Liaison hors-cible: ZFN>TALEN *Difficulté de construire le complexe		<b>*Parfois, présence de liaisons hors-cible</b>
Avantages	*Peu de liaisons hors-cible	*Meilleure fréquence de recombinaison qu'avec les méga nucléases *Prémices de la programmation des outils		<b>*Flexible *Programmable *Facile à mettre en place</b>

## 2.1. Principe du système CRISPR/Cas

CRISPR/Cas ( Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR-associated protein) est un outil de défense immunitaire naturellement présent chez les bactéries et les archées qui permet de dégrader l'ADN viral envahissant (Barrangou et al., 2007; Bhaya et al., 2011). Il a été découvert dans un premier temps chez *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). En réponse à une infection virale, les bactéries intègrent dans leur génome de courts fragments d'ADN exogène (Wiedenheft et al., 2012). L'insertion se fait à l'extrémité d'un élément appelé CRISPR

(Andersson and Banfield, 2008; Garneau et al., 2010). En effet, le locus CRISPR contient des courtes séquences d'ADN répétitives et palindromiques régulièrement espacées par des « spacers » (Andersson and Banfield, 2008; Garneau et al., 2010; Wiedenheft et al., 2012) (Figure 35). Les spacers représentent des enregistrements génétiques d'anciennes attaques virales et constituent ainsi la carte immunitaire de la cellule (Wiedenheft et al., 2012) (Figure 35). Les loci CRISPR sont transcrits en ARN appelés crRNA qui circulent dans tout l'environnement intracellulaire, à la recherche d'ADN viral (Andersson and Banfield, 2008). Les crRNA sont associés à d'autres ARN, les tracrRNA qui permettent leur maturation et leur activation (Barrangou et al., 2007; Bhaya et al., 2011; Xing et al., 2014).

Le locus CRISPR contient aussi une séquence adjacente aux loci répétitifs, appelée « leader » ; celle-ci est riche en adénine (A) et thymine (T) et joue le rôle de promoteur de transcription des loci (Jansen et al., 2002) (Figure 35). En plus du leader, une série de 4 à 10 gènes appelés Cas (CRISPR-associated genes) a été identifiés (Jansen et al. 2002; Kunin et al. 2007). Ces gènes codent pour différentes protéines nucléases capables de générer des coupures dans les brins d'ADN (Figure 35).

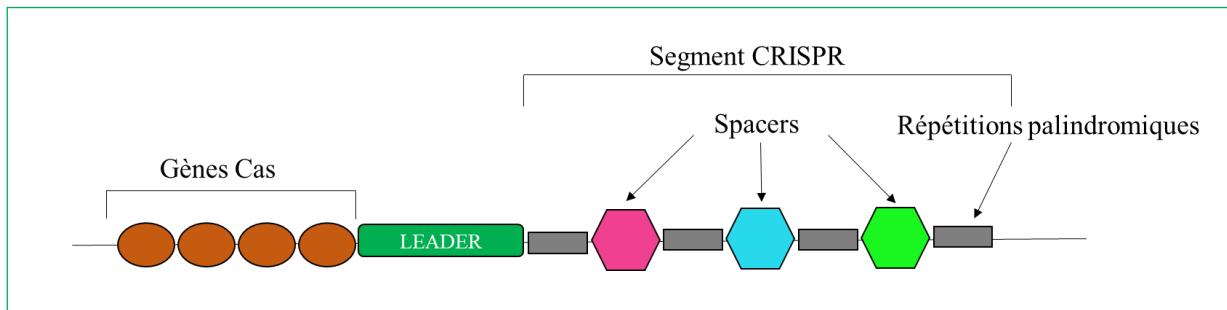


Figure 35 : Différents éléments du locus CRISPR

## 2.2. Types de CRISPR/Cas

Selon les gènes codants pour les protéines Cas dans le locus CRISPR, il existe trois types du système CRISPR/Cas (Makarova et al., 2011) :

- Type 1 : les gènes Cas du locus CRISPR codent pour la protéine Cas3
- Type 2 : il contient seulement 4 gènes Cas qui codent pour la protéine Cas9
- Type 3 : il se divise en 2 groupes. Le groupe A dans lequel les gènes codent pour une protéine Cas qui attaque les plasmides ADN. Le groupe B dans lequel les gènes codent pour une protéine qui attaque les simples brins d'ARN.

Les trois types existent souvent ensemble dans un même organisme (Makarova et al., 2011). Le type 2 connu sous le nom de CRISPR/Cas9, le plus simple et le plus utilisé en biologie

moléculaire, provient de *Streptococcus pyogenes* (Barrangou et al., 2007; Garneau et al., 2010). La protéine Cas9 présente une structure bilobée à deux domaines nucléases (RuvC et HNH) permettant la coupure d'un brin d'ADN (Nishimasu et al., 2014; Wiedenheft et al., 2012; Jinek et al., 2014) (**Figure 36**).

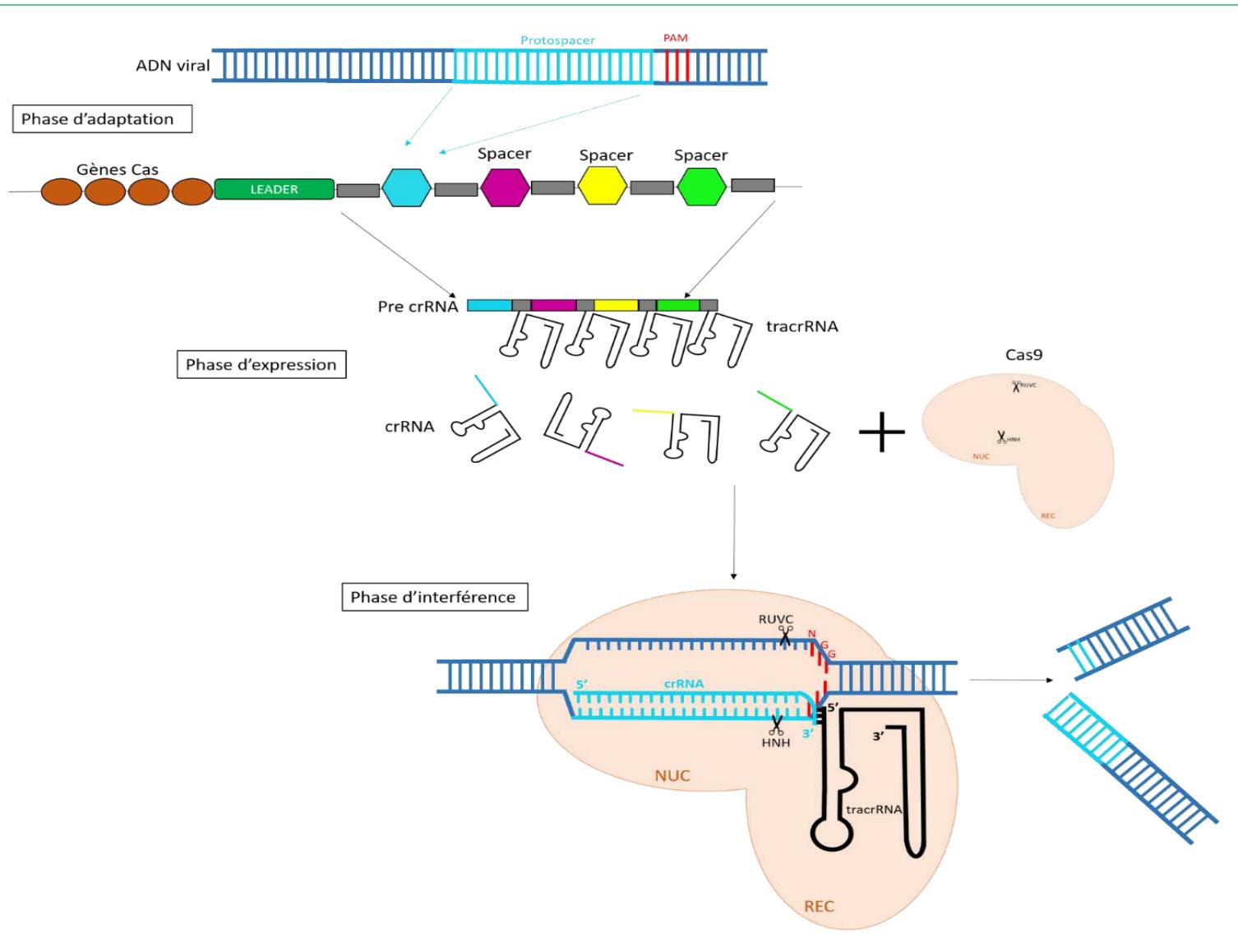
### 2.3. Mécanisme du CRISPR Cas9 chez les bactéries

Le mécanisme de la CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* comporte trois phases (Terns and Terns, 2011; Wiedenheft et al., 2012; Jinek et al., 2012) (**Figure 36**):

- *Phase d'adaptation* : une fois l'ADN viral injecté dans la bactérie, cette dernière va reconnaître un court fragment de l'ADN viral appelé protospacer. Elle choisit le protospacer d'une manière à ce qu'il soit à côté d'un motif d'ADN appelé PAM (Protospacer Adjacent Motif). Ce motif est constitué de trois nucléotides (NGG). Une fois choisie, la séquence virale sera ajoutée à l'extrémité des loci répétitifs CRISPR sous forme d'un nouveau spacer.

- *Phase d'expression* : La cellule transcrit l'ensemble des loci CRISPR en un long ARN appelé pre-crRNA sur lequel se raccrochent les tracrRNA. Les tracrRNA permettent la fragmentation de la pre-crRNA en des petites crRNA matures qui contiennent chacune un spacer capable de s'apparier à son ADN viral complémentaire (protospacer). La protéine Cas9 s'associe à chacun du duplex crRNA/tracrRNA pour former l'ensemble du ciseau moléculaire.

- *Phase d'interférence* : une fois l'ensemble ribonucléoprotéique formé, celui-ci va reconnaître l'ADN viral au niveau du protospacer par complémentarité et grâce à la présence du PAM. La présence du PAM indique à la Cas9 que la séquence sur laquelle elle est accrochée est bien virale. La Cas9 coupe les deux brins d'ADN viraux au niveau du troisième nucléotide après le PAM. Ainsi coupé, l'ADN viral est fragmenté et dégradé.



**Figure 36 :** Mécanisme CRISPR/Cas9 bactérien. Le système CRISPR/Cas est utilisé comme outil de défense immunitaire chez les bactéries. Il est divisé en trois phases ; phase d'adaptation, phase d'expression et phase d'interférence. Phase d'adaptation : la bactérie ajoute un fragment de l'ADN viral (protospacer) dans son locus CRISPR sous forme d'un nouveau spacer. Phase d'expression : formation du complexe crRNA/tracRNA et son association avec la protéine Cas9. La protéine Cas9 contient le lobe NUC responsable de la reconnaissance et de la liaison de l'ADN viral. Ce lobe contient deux sites de coupures RVUC et HNH et le lobe deuxième REC dans lequel va se loger le complexe crRNA/tracRNA. Phase d'interférence : le complexe crRNA/tracRNA va guider la Cas9 vers le protospacer viral complémentaire. Une fois l'ADN viral hybride avec la crRNA, il est coupé au niveau du protospacer par le site HNH et au niveau du brin complémentaire par le site RVUC. La coupure du double brin d'ADN viral conduit à son dysfonctionnement.

#### 2.4. Transition du CRISPR/Cas9 bactérien en outil d'édition génétique

L'utilisation de la CRISPR/Cas9 dans des organismes autres que les bactéries, est possible grâce à une ARN synthétique appelée sgRNA (single guide RNA). La sgRNA avec sa structure en épingle à cheveux imite le duplex crRNA/tracRNA (Jinek et al., 2012). Elle est capable de se lier à la Cas9 et guider la protéine vers l'ADN cible ( Xing et al., 2014; Li et al., 2015; Belhaj et al.,

2015). La séquence de la sgRNA est commune pour tous les gènes ciblés sauf au niveau des 20 premiers nucléotides. Ces nucléotides sont construits d'une manière à ce qu'ils soient complémentaires à une séquence de l'ADN ciblé située après un PAM (Jinek et al., 2012).

## 2.5. Application chez les plantes

Des nombreuses études ont montré l'efficacité de la CRISPR/Cas9 dans plusieurs plantes tel que *N. benthamiana* (Li et al., 2013), *N. tabacum* (Gao et al., 2015), *A. thaliana* (Li et al., 2013; Jiang et al., 2013; Fauser et al., 2014; Khumsupan et al., 2020), le blé (Kumar et al., 2019; Kim et al., 2018), le maïs (Liang et al., 2014; Young et al., 2019), le riz (Miao et al., 2013; Romero and Gatica-Arias, 2019), la tomate (Brooks et al., 2014; Reem and Van Eck, 2019) et l'orange (Jia and Wang, 2014). Dans certains cas, l'efficacité du système CRISPR Cas9 peut atteindre 90%.

Les gènes codants pour la sgRNA et la Cas9, en plus d'un gène de sélection rassemblé dans un vecteur, sont délivrés aux plantes par plusieurs techniques telle que la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* ou par transfert direct (biolistique, électroporation des protoplastes) (Belhaj et al., 2015). De plus, il est possible d'insérer plusieurs sgRNA dans un même vecteur afin de cibler plusieurs gènes en même temps et cela par l'assemblage Golden Gate. Le système Golden Gate consiste à rassembler plusieurs séquences d'ADN à partir de différents vecteurs dans un seul, sous l'action des enzymes de restriction type IIS (Engler et al., 2009).

## 2.6. Types de mutants générés

Il existe plusieurs types de mutants CRISPR/Cas9 pouvant être générés. Selon le type de mutation qui a eu lieu sur chaque allèle, les mutants peuvent être homozygotes (même délétion ou insertion au niveau des allèles), bialléliques (délétion ou insertion différentes sur chaque allèle), hétérozygotes (un allèle est seulement muté), ou chimériques ou mosaïques (3 ou plusieurs allèles pour un seul gène) (Brooks et al., 2014; Ma et al., 2015a, 2015b; Liu et al., 2015). L'analyse de la première génération des transformants T0 chez plusieurs plantes a montré une grande efficacité ; la majorité des plantes générées sont hétérozygotes, chimériques ou bialléliques, et une faible proportion homozygotes augmente dans les générations suivantes (Miao et al., 2013; Feng et al., 2014; Zhang et al., 2014; Brooks et al., 2014; Minkenberg et al., 2017; Kumar et al., 2019). En effet, les mutations s'avèrent persistantes dans la génération suivante (T1) ; elles ont été transmises suivant la loi mendéienne sans réversion ou nouvelle mutation (Feng et al., 2014; Zhang et al., 2014; Belhaj et al., 2015; Reem and Van Eck, 2019). Pour s'assurer que les sites édités seront fixes et ne se cliveront plus dans les générations suivantes, il est préférable de sélectionner les mutants T1 ayant perdu le gène de la Cas9 (Feng et al., 2014; Brooks et al., 2014; Peterson et al., 2016).

Ainsi, en sélectionnant les mutants sans Cas9, la plante va transmettre à ses descendants les gènes mutés sans leur transmettre la cas9, ce qui évite une nouvelle mutation dans les générations suivantes.

## 2.7. Travaux réalisés dans ce chapitre

Dans ce chapitre, mon objectif était de construire des lignées stables de tomates dont l'accumulation en phénolamides pourrait être modifiée (à la hausse ou à la baisse) afin d'élucider la ou les fonctions physiologiques de ces métabolites. J'ai développé les outils permettant de réaliser la surexpression ou au contraire l'extinction par édition génétique de gènes clé, ou supposés comme tel, dans l'accumulation de phénolamides. Ces gènes sont les 4 identifiés au laboratoire codant pour des putrescine-hydroxycinnamoyl-transférase (PHT) ainsi que le gène solyc06g083900.2 (*S/*MYB13) orthologue potentiel de *NaMYB8*.

Dans le chapitre précédent, j'ai réalisé les constructions permettant de surexprimer les gènes *S/PHT1*, *S/PHT2*, *S/PHT3*, *S/PHT4* et solyc06g083900.2 dans le vecteur pGWB2 sous le contrôle du promoteur 35S (Nakagawa et al., 2007) visant à suraccumuler des phénolamides chez les tomates. Il me reste à faire des constructions qui me permettent de créer des lignées où l'accumulation des phénolamides est éteinte ou diminuée. Dans ce chapitre j'ai recouru à l'outil CRISPR/Cas9 pour faire les constructions me permettant d'éteindre les gènes en appliquant le système de rassemblement de plusieurs fragments d'ADN dans un seul vecteur final, appelé système Golden Gate dans le vecteur pAGM4723. Ensuite je présente le travail réalisé pour obtenir des lignées de tomate T0 et T1 chez deux variétés *Ailsa Craig* et *WVa106* dans lesquelles les niveaux d'expression des gènes *S/PHT1*, *S/PHT2*, *S/PHT3*, *S/PHT4* et solyc06g083900 sont modulés.

# 3. Matériels et méthodes

## 3.1. Matériels biologiques

**Les graines de tomate** des variétés *Ailsa Craig* (*Solanum lycopersicum*) et « West Virginia 106 » (*WVa106 Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) nous sont fournies par le laboratoire BFP de Bordeaux. Je les ai mises en germination dans du terreau puis disposées en serre jusqu'au stade de fruit pour faire mon propre stock de graines. Ensuite, j'ai utilisé ces graines pour la régénération des tomates transgéniques. *Ailsa Craig* et *WVa106*, portent généralement des bouquets de 4 à 6 fleurs, ces bouquets se développent pour donner des fruits type « cerises » pour les *WVa106* et des

fruits de taille moyenne pour Ailsa Craig. Les deux variétés sont des tomates à croissance indéterminée. *Ailsa Craig* présente des feuilles plus grandes et une tige plus épaisse.

**Les *Agrobactérium tumefaciens* de la souche EHA105**, électrocompétentes et résistantes à la rifampicine (gène Rif<sup>R</sup>) (Hood et al., 1993) sont utilisées pour la transformation des cotylédons des tomates avec les constructions finales de surexpression et de CRISPR/Cas9.

**La souche de bactérie *Escherichia coli* MC1022** (génotype : araD139, Δ(ara, leu)7697, Δ(lacz)M15, galU, galK, strA) électrocompétentes a été utilisées pour le clonage des plasmides à envoyer au séquençage.

**La souche de bactérie *Escherichia Coli* TOP10**, One Shot<sup>TM</sup> TOP10 chimiquement compétentes (Invitrogen<sup>TM</sup>) est utilisée pour le système Golden Gate.

### 3.2. Matériels génétiques

**Amorces.** Elles sont représentées dans le **Tableau 8**

des amorces utilisées

Gene ou nom	Amorce directe	Amorce Reverse	Descriptions	Utilisation
SIPIH71	sgRNA1: TGTGGTCTCAATTGAGCACGATCGTTCATGGGAGTTTAGAGCTAGAAATAGC AAG sgRNA2: TGTGGTCTCAATTGCGAAGCTGGTTGATAGGTTTAGAGCTAGAAATAGC AG		Site de reconnaissance de Bsal 20 nucléotides spécifiques de chaque gène	
SIPIH72	sgRNA1: TGTGGTCTCAATTGTTGGTCATTACCGGGAGTTAGAGCTAGAAATAGC AG sgRNA2: TGTGGTCTCAATTGCGACGGGGATCCCGAGTTAGAGCTAGAAATAGC AAG			*Construire les sgRNA
SIPIH73	sgRNA1: TGTGGTCTCAATTGCGCCATTGCGGCTGGTTAGAGCTAGAAATAGC AG sgRNA2: TGTGGTCTCAATTGCGACACATTTCAAGGGTTTAGAGCTAGAAATAGC AG	TGTGGTCTCAAGGTAATGCCAACTTTGAC	scaffold de la sgRNA inséré dans le plasmide « pICH86966 »	
SIPIH74	sgRNA1: TGTGGTCTCAATTGCGGTAACACACTAGTTAGAGCTAGAAATAGC AG sgRNA2: TGTGGTCTCAATTGCTGACACATTTCAAGGGTTAGAGCTAGAAATAGC AG		Surligné les 4 paires de base qui permettront la ionction du promoteur ATU6 à la sgRNA et le plasmide dans la première étape Lv1 du Golden Gate	
Solyc06g083900.2	sgRNA1: TGTGGTCTCAATTGTTGGGAGTGTGGCAGGCCATTGTTAGCTAGAAATAGC G sgRNA2: TGTGGTCTCAATTGCAAACACTTGGTCTATAGTTAGCTAGAAATAGC AG			
Lv1		CTGGTGGCAGGATATTGGTGG	GAACCCCTGGTGGCATGACACATAC	*Rassemblement Golden Gate
Lv2		AGGATCGATCTCACAGCT	AGGGCGTGAAGAGGTTATCCGCTC	*Vérifier l'insertion des sgRNA dans le génome des plantes
35S prom+Cas9	CAGTGGTCCAAAAGATGGACCC		TACTGATCTCGAATCTGAGCGAGGAG	*Détecter la présence de la Cas9 dans les plantes
SIPIH1			TCAATTGCTTCAAATCTAGAG	
SIPIH2			ACAAGGGCGCTCAAGCAAGTCAAAAGAATAG	*Détecter l'intégration des constructions de surexpression dans le génome des plantes
SIPIH3			ACAAGGGCGCTTAATCTCAAGCAAGTCCAAAGGAATAAA	
SIPIH4			TCACTATCTGTCGGCCATT	
Solyc06g083900.2			TCATTITGCTTCAAATCTAGAGAG	
SIPIH1	AGGAGATATACCATGGTAATGTGAAAATTGAGAGTTCAAAATC		ACAAGGGCGCTCAAGCAAGTCAAAAGAATAG	*Cibler par PCR des mutations génétiques introduites au niveau de chaque gène
SIPIH2	AGATTAGCCATTCAATTCTAGAAAGAAATGCTAAC		ACAAGGGCGCTTAATCTCAAGCAAGTCCAAAGGAATAAA	
SIPIH3	ACACAGGATCCATGAGGTCAAATAGAAAAGTTCAAAATC		TCAACTATCTGTCGGCCATT	
SIPIH4	ACACAGGATCCATGAGGTAAATAGAAAAGTTCAAGGATT		GTGGAATATGCCCATAAACACCATGTCACCA	
Solyc06g083900.2	CAGCTCCAAGTCCAGTGA		CCATAACACTATGTCATACCAAAAAAATCTATCGGAA	*Séquencer des parties de l'ADN des plantes transgéniques qui entourent de part et d'autre la région ciblée par CRISPR/Cas9
SIPIH1	ATGGAATGTGAAAATTGAGAGTTCTCAAAATCAAGCCAT		CTGGGTCCCTTATGTCATACTCGATAAGA	
SIPIH2	ATGGTAATCGAGGATTCTCAATTGATGGGG		AAGTGATTGAGTCACCCAAATAAGAAATCTCAG	
SIPIH3	ATGAAAGGTCAAATAGAAAAGTCAAAATCAAGGCTTC		GGTCCCGAGTAGTATGGCACAAAGT	
SIPIH4	ATCGAGACTGGGTGAAATTAGGG		GCTGGCGTTCTGGCTTAGG	Amplifier le gène de ménage
Solyc06g083900.2	TTATGCTATAGCTCCAAGTCCAAAGTCAAAATC		TCATTITGCTTCAAATCTAGAGAG	Détecter l'insertion des constructions de surexpression dans les plantes transgéniques
TP41	ATGGAGTTTGTAGTCTCTGC		ACAAGGGCGCTTAATCTCAAGCAAGTCCAAAGGAATAAA	
SIPIH1			TCACTAATCTGTCGGCCATT	
SIPIH2				
SIPIH3	AGATTAGCCATTCAATTCTAGAAAGAAATGCTAAC			
SIPIH4				
Solyc06g083900.2				

## Les plasmides

\*Le plasmide **pICH86966**: AtU6p::sgRNA\_PDS (Addgene plasmid # 46966 ; <http://n2t.net/addgene:46966> ; RRID: Addgene\_46966) portant la résistance kanamycine, est utilisé pour amplifier le scaffold de la sgRNA.

\*Les plasmides **pICH47751** (Addgene plasmid # 48002; <http://n2t.net/addgene:48002>; RRID: Addgene\_48002), **pICH47761** (Addgene plasmid # 48003; <http://n2t.net/addgene:48003>; RRID: Addgene\_48003), **pICH47772** (Addgene plasmid # 48004; <http://n2t.net/addgene:48004>; RRID: Addgene\_48004), **pICH47781** (Addgene plasmid # 48005; <http://n2t.net/addgene:48005>; RRID: Addgene\_48005) sont utilisés pour le clonage de niveau 1. Ils portent la résistance à l'ampicilline et le marqueur de sélection « opéron LacZ » qui code pour la  $\beta$ -galactosidase. Cette enzyme hydrolyse le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) en libérant sa partie indolique. La partie indolique s'oxyde et donne une coloration bleue. Cela permet d'identifier les colonies portant ce marqueur dans un milieu contenant du X-gal. Le *lacZ* dans ces plasmides va être remplacé par les sgRNA. Ainsi, les colonies positives perdront la couleur bleue et seront de couleur blanche.

\*Le plasmide **pICSL01009**: AtU6p (Addgene plasmid # 46968; <http://n2t.net/addgene:46968>; RRID: Addgene\_46968) porte la résistance à la spectinomycine et code pour le promoteur U6 d'*Arabidopsis thaliana*. Le promoteur est entouré de part et d'autre par les sites de restriction *Bsa*I qui sont détruits après clonage. Ce plasmide est utilisé pour ajouter le promoteur *AtU6* sur la sgRNA.

\*Le plasmide **pORFE1001** (Addgene plasmid # 112079; <http://n2t.net/addgene:112079>; RRID: Addgene\_112079) porte la résistance à l'ampicilline et le gène codant pour la protéine Cas9 de *S. pyogenes* sous le promoteur 2X35S. La séquence 2X35S::Cas9 est entourée de part et d'autre par les sites de restrictions *Bpi*I détruits après clonage. Ce plasmide servira dans le niveau 2 de clonage en donnant 2X35S::Cas9 au plasmide final.

\*Le plasmide **pICH41780** (Addgene plasmid # 48019; <http://n2t.net/addgene:48019>; RRID: Addgene\_48019) porte la résistance à la spectinomycine. Ce plasmide sera linéarisé grâce à l'enzyme *Bpi*I et va servir comme end linker dans le plasmide final à 2 sgRNA au niveau 2 du clonage.

\*Le plasmide **pICH41822** (Addgene plasmid # 48021; <http://n2t.net/addgene:48021>; RRID: Addgene\_48021) porte la résistance à la spectinomycine. Ce plasmide sera linéarisé grâce

à l'enzyme *BpiI* et va servir comme end-linker dans le plasmide final à 4 sgRNA au niveau 2 du clonage.

\*Le plasmide **pICSL11024** (pICH47732::NOSp-NPTII-OCST) (Addgene plasmid # 51144 ; <http://n2t.net/addgene:51144> ; RRID:Addgene\_51144) porte la résistance à l'ampicilline et le gène qui attribue la résistance kanamycine aux plantes. Ce gène est entouré de part et d'autre avec les sites de restriction *BpiI* qui sont détruits après clonage. Il est utilisé au niveau 2 de clonage.

\*Le plasmide **pAGM4723** (Addgene plasmid # 48015; <http://n2t.net/addgene:48015>; RRID: Addgene\_48015). Ce plasmide servira comme plasmide final des constructions. C'est un vecteur binaire T-DNA qui permet la transformation des plantes. Il porte la résistance à la kanamycine en plus de l'opéron canthaxanthin. La canthaxanthine, une fois synthétisée, s'oxyde et donne une coloration orange, qui permet d'identifier les colonies transformées. Cet opéron, entouré de part et d'autre par les sites de restriction *BpiI*, sera remplacé par les différentes séquences assemblées au niveau 2 de clonage.

\* Le plasmide **pGWB2 Gateway binary vector** (BioVector NTCC Inc.). Ce plasmide contient les constructions de surexpression (voir chapitre 2). Il porte la résistance à la kanamycine et sera utilisé pour transformer les plantes.

\* Le plasmide **pCR™8/GW/TOPO™** est utilisé pour le clonage des gènes à partir des produits PCR de l'ADN génomique des plantes pour envoyer au séquençage.

### 3.3. Constructions CRISPR-Cas9

#### 3.3.1. Outil bio-informatique : CRISPOR

L'outil bio-informatique CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) permet d'identifier, à partir de l'ADN génomique du gène ciblé, toutes les séquences de 20 nucléotides qui viennent après le motif PAM (le motif de trois nucléotides NGG) (Figure 37). Il permet de plus de prédire les hors-cibles de la sgRNA correspondante et propose plusieurs critères de classification de ces séquences. Les critères que j'ai choisis pour sélectionner les séquences sont p39r ordre :

- Score de spécificité (Specificity score) > à 95%
- Score de décalage de cadre de lecture (out-of-frame score) le plus haut possible
- Nombre des offs-target et leur répartition dans le génome. Par préférence j'ai choisi uniquement les offs-target dans les régions intergéniques pour ne pas modifier des gènes non ciblés.
- J'ai choisi 2 sgRNA proches (séparées de moins de 300pb si c'est possible) pour favoriser la création d'insertions ou de délétions (INDEL) dans la zone d'intérêt.

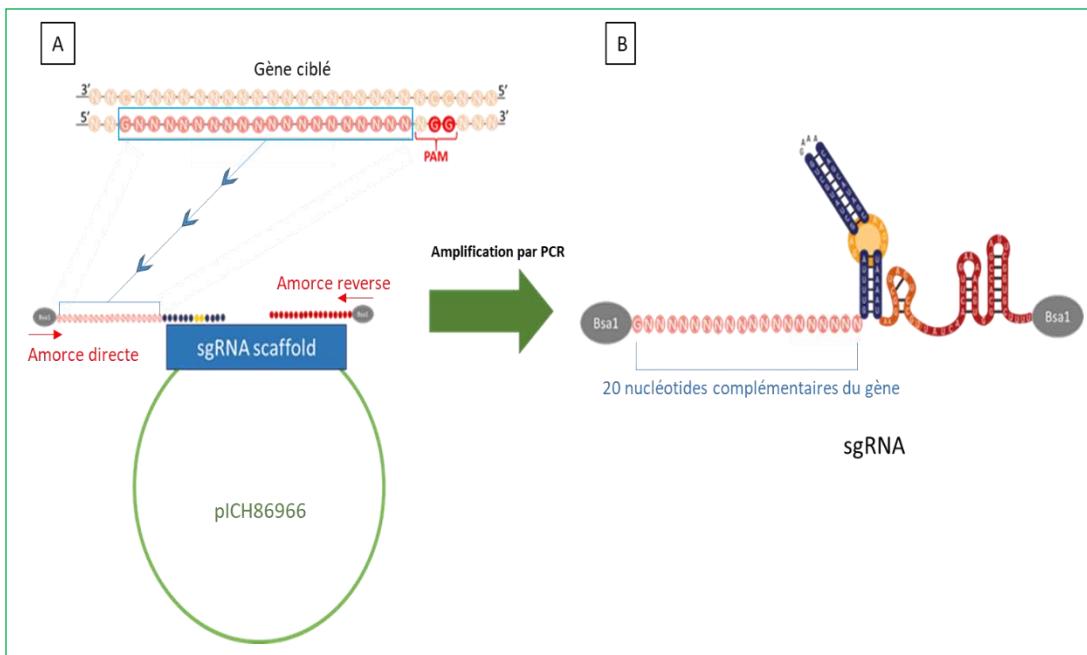
- Si possible que la séquence commence par la base G. En effet pour le promoteur U6 qui sera ajouté ultérieurement la transcription commence à la base G. Si la séquence ne commence pas par G, cette dernière peut être ajouter lors de la commande des amorces.

**Figure 37 :** Logiciel crispor. A : En première étape il faut insérer la séquence d'ADN génomique du gène ciblé et son nom (step 1), ensuite il faut choisir le génome duquel provient la séquence (step 3) et enfin sélectionner le type de motif PAM ciblé, pour mes travaux sur la tomate, j'ai choisi le type « 20bp-NGG -Sp Ca9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1 » puis cliqué submit. B : Le logiciel affiche les séquences de 20 nucléotides qui peuvent être ciblés en cherchant le motif NGG dans les deux brins d'ADN (sens directe et indirecte). La liste des séquences est affichée d'une manière à pouvoir les localiser sur le gène (cadre vert), mais aussi en forme de liste dans le tableau en rose, en fonction des différents paramètres. En astérix rouge les principaux paramètres auxquels je me basais pour la sélection des séquences.

Une fois que j'ai choisi les séquences je les ai intégrés dans la structure suivante : (à la place des nucléotides en rouge), et les ai commandés sous forme d'amorce directe :

### 3.3.2. Construction des sgRNA

La séquence de la sgRNA comporte deux parties essentielles. La première, avec laquelle elle commence, est composée de 20 nucléotides spécifiques d'une séquence du gène ciblé (**Figure 38**). La seconde, avec laquelle elle se termine, est une séquence qui lui permet de se raccrocher à la Cas9. Cette dernière partie est la même pour tous les sgRNA. Ces deux parties sont ajoutées de part et d'autre d'une structure présente dans le plasmide pICH86966 par amplification PCR pour former la sgRNA (**Figure 38**). Ainsi la sgRNA a la structure suivante pour tous les gènes, la seule différence est la séquence rouge de 20 nucléotides (en rose site de reconnaissance de BsaI et en bleu les sites de restriction de BsaI et en souligné les 4 paires de base qui permettront la jonction de la sgRNA à son promoteur AtU6 et au plasmide dans la première étape LVL1 du Golden Gate).



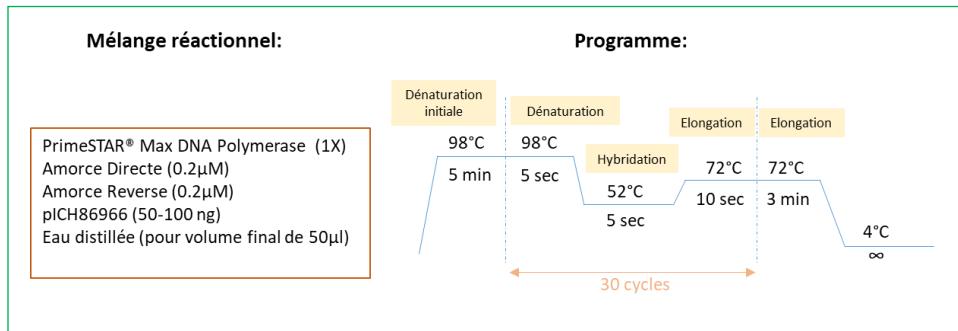
**Figure 38 :** Construction de la sgRNA. A : L'amorce directe est construite de manière à contenir le site de reconnaissance *BsAI* suivi de 20 nucléotides complémentaires à celles ciblées du gène, en plus d'une séquence qui va s'hybrider avec le scaffold dans le plasmide. L'amorce reverse est construite de manière à s'hybrider avec la fin du scaffold du plasmide en ajoutant le site de reconnaissance de *BsAI*. B : après amplification par PCR la sgRNA est construite.

AGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTT

TTTTCTAGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCATTCGCTTGAGACCACA3'(165p)

b)

L'amplification PCR est réalisée avec le prémix de PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 2X (Takara Bio Inc.) selon les conditions de la **Figure 39** avec les amores citées dans le paragraphe 4.2. Pour chaque gène, j'ai construit 2 sgRNA ciblant chacune une séquence différente du gène pour augmenter l'efficacité de l'édition génétique en coupant le gène au niveau de deux sites différents.



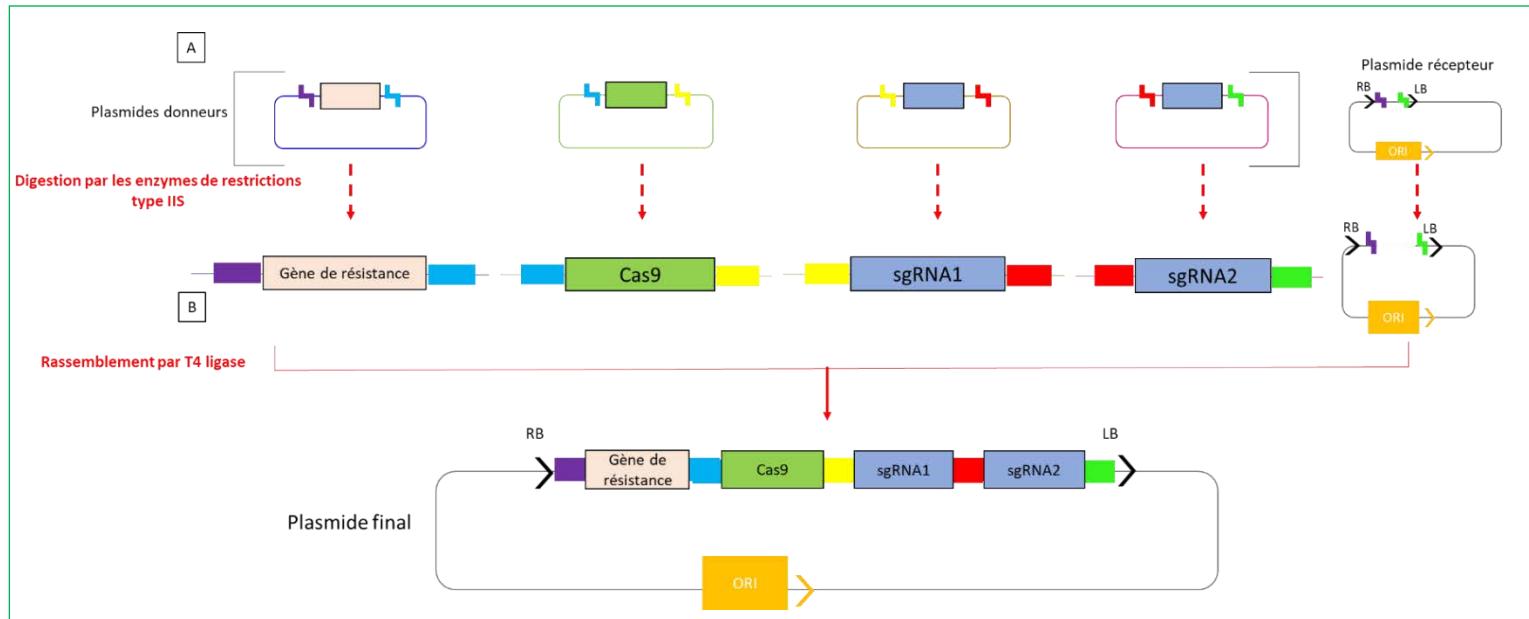
*Figure 39 : Réaction PCR pour construire la sgRNA*

### 3.3.3. Migration sur gel d'agarose et purification des sgRNA

Les sgRNA issues de la réaction PCR sont migrés sur gel d'agarose 1% dans du tampon TAE. Le tampon TAE contient de Tris 40 mM acétate, d'EDTA 1mM pH8 et de 1.25% d'acide acétique. Le marqueur de taille utilisé est l'Exact Ladder DNA premix 2log. Après migration, le gel est incubé pendant 20 minutes dans un bain de BET 0.04% dilué dans l'eau. La révélation est réalisée sous lumière UV. Les bandes correspondant aux sgRNA sont extraits du gel d'agarose avec le kit "Nucleospin Gel and PCR Clean Up" (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) selon le mode opératoire du fournisseur, élus et enfin stockés à -20°C.

### 3.3.4. Système Golden Gate

Le principe du clonage Golden Gate est la recombinaison d'une séquence d'ADN d'un plasmide vers un autre sans ajout de nucléotides au niveau des sites de recombinaisons (Figure 40) (Kirchmaier et al. 2013; Pryor et al. 2020). Cette technique se base sur des enzymes de restrictions de type II S qui coupent à l'extérieur de leurs sites de reconnaissances. Ainsi, une fois que la ligation a eu lieu, les sites de restriction des enzymes sont détruits (Pryor et al., 2020) (Figure 40). Les séquences seront libérées de leur vecteur initiaux, avec des extrémités complémentaires à celle du vecteur récepteur final, ou bien complémentaires avec d'autres séquences libérées. De cette manière, le rassemblement grâce à la T4 ligase, aura lieu dans un ordre précis, suivant la complémentarité des extrémités des séquences. Le clonage Golden Gate a été utilisé pour la première fois pour la technique CRISPR par Ma et al. (2015) puis optimisé par Ma et Liu (2016).



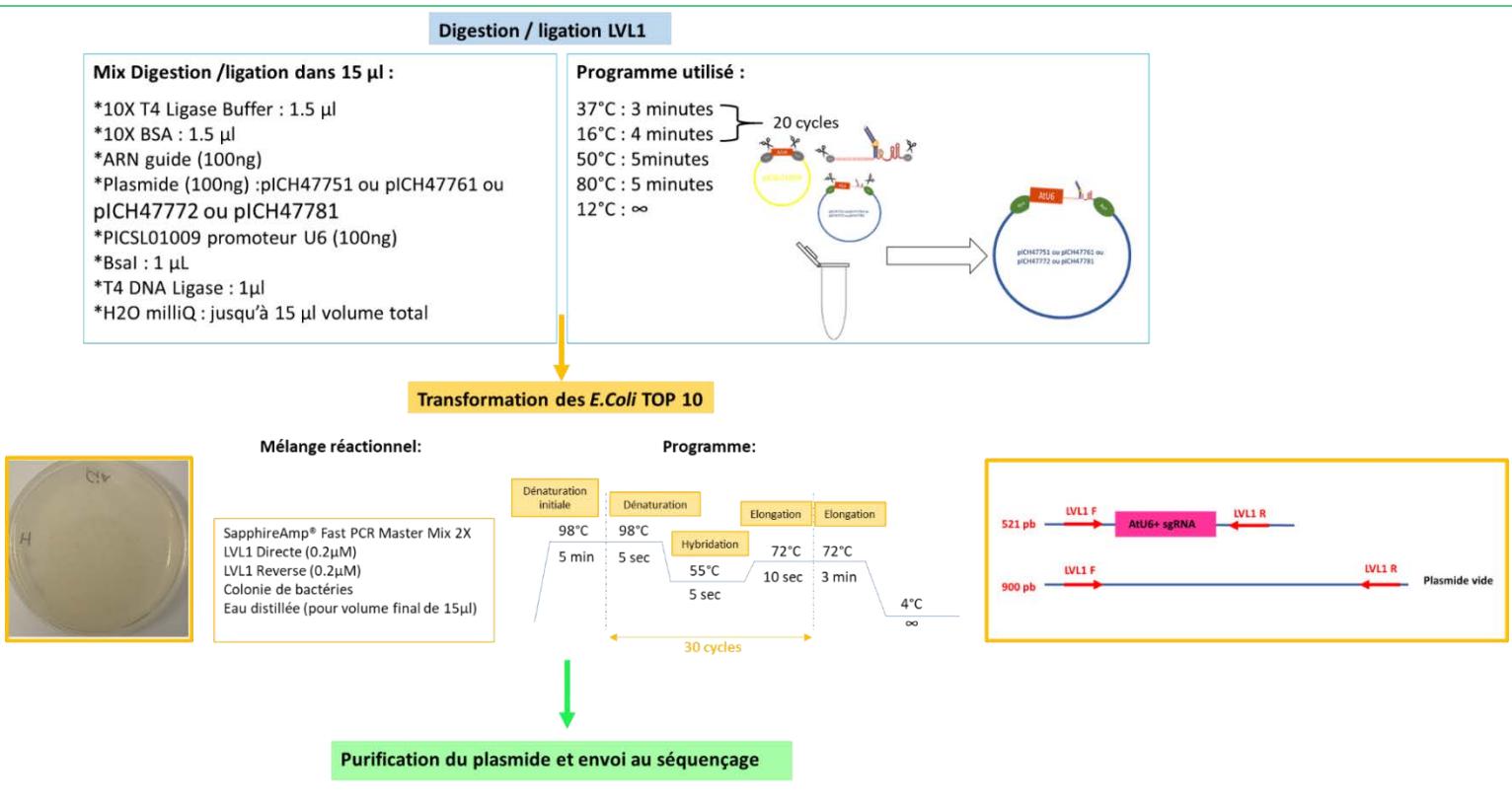
**Figure 40 :** Système Golden Gate utilisé pour le rassemblement du vecteur final CRISPR Cas9. A : La première étape est de libérer les séquences d'intérêt de leurs plasmides par digestion avec ces enzymes. La digestion génère respectivement des extrémités qui permettent de rassembler les séquences dans l'ordre désiré. B : La deuxième étape est le rassemblement des séquences par la T4 ligase dans le plasmide final.

### 3.3.5. Rassemblement des plasmides de niveau 1 (LVL1)

A cette étape, le sgRNA doit être assemblé avec le promoteur « AtU6 » dans un seul vecteur. Le promoteur AtU6 se trouve dans le plasmide « pICSL01009 » duquel il est libéré par digestion avec *Bsa*I (enzyme de restriction type IIS). Ensuite sgRNA et AtU6 sont rassemblés dans le vecteur grâce à l'enzyme T4 ligase. Pour un même gène ciblé, chacun des deux sgRNA doit être assembler avec son AtU6 dans deux vecteurs différents. Pour chaque gène, j'ai rassemblé le sgRNA1+ AtU6 dans le vecteur pICH47751, et le sgRNA2+ AtU6 dans pICH47761. L'ajout du promoteur AtU6 et la ligation sont réalisés en une seule étape de digestion (par *Bsa*I) / ligation (par T4 ligase) (Figure 41). Dans le cas d'extinction de deux gènes en même temps, il me faut 4 sgRNA (deux pour chaque gènes). Alors à cette étape, j'ai rassemblé le sgRNA1+ AtU6 et le sgRNA2+ AtU6 du premier gène, respectivement dans pICH47751 et pICH47761, tandis que le sgRNA1+ AtU6 et le sgRNA2+ AtU6 du deuxième gène, respectivement dans pICH47772 et pICH47781.

Avec les produits de digestion / ligation j'ai transformé des aliquots de 50µl de *E.Coli* Top10, par choc thermiques à 42°C en suivant l'instruction du fournisseur. Juste après le choc, les bactéries sont déposées sur glace pour 2 minutes et 300µl de LB sont ajoutés sur les aliquots. La solution bactérienne est incubée 1h à 37°C puis étalé sur une boite de Pétri LB+ carbenicilline (100µg/mL) + IPTG (0.5 mM) + X-Gal (40µg/mL). La boite de Pétri est placée à 37°C pendant 16 heures.

Après 16 h, les colonies positives qui contiennent le vecteur avec la sgRNA+AtU6 sont de couleurs blanches alors que les colonies négatives qui portent le vecteur vide sont de couleurs bleues (**voir paragraphe 3.2, plasmides**) (**Figure 41**). Un criblage PCR sur les colonies positives est réalisé en utilisant les amores LVL1 et un prémix, SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 2X (Takara Bio Inc.) (**voir paragraphe 3.5.d du chapitre 2**). Ce prémix contient une polymérase sans activité correctrice. Le programme utilisé pour cette amplification PCR est représenté dans la **Figure 41**. Ensuite, les produits d'amplification sont migrés sur gel d'agarose 1% et après révélation du gel dans le BET et sous lumière UV, les colonies positives donnent des bandes de 521 pb et les colonies négatives donnent une bande de 900 pb (**Figure 41**). Celles positives sont ensemencées dans 4 mL de LB+ ampicilline et mises en culture durant 16 heures à 37°C/180 rpm. La purification du plasmide est réalisée à partir de ces bactéries avec le kit "NucleoSpin Plasmid" (Macherey-Nagel) en suivant le mode opératoire du fournisseur. Le plasmide est élué dans un volume total de 50  $\mu$ l. puis quantifié en spectrophotométrie (Biophotometer Eppendorf, Hambourg, Allemagne) contre un blanc (70  $\mu$ l d'eau osmosée stérile), à partir de 5  $\mu$ l du plasmide dilué dans 65  $\mu$ l d'eau osmosée stérile. Quinze  $\mu$ l du plasmide purifié sont ensuite envoyés au séquençage avec les amores LVL1 et le reste est conservé à -20°C pour le deuxième niveau de rassemblement Golden Gate.



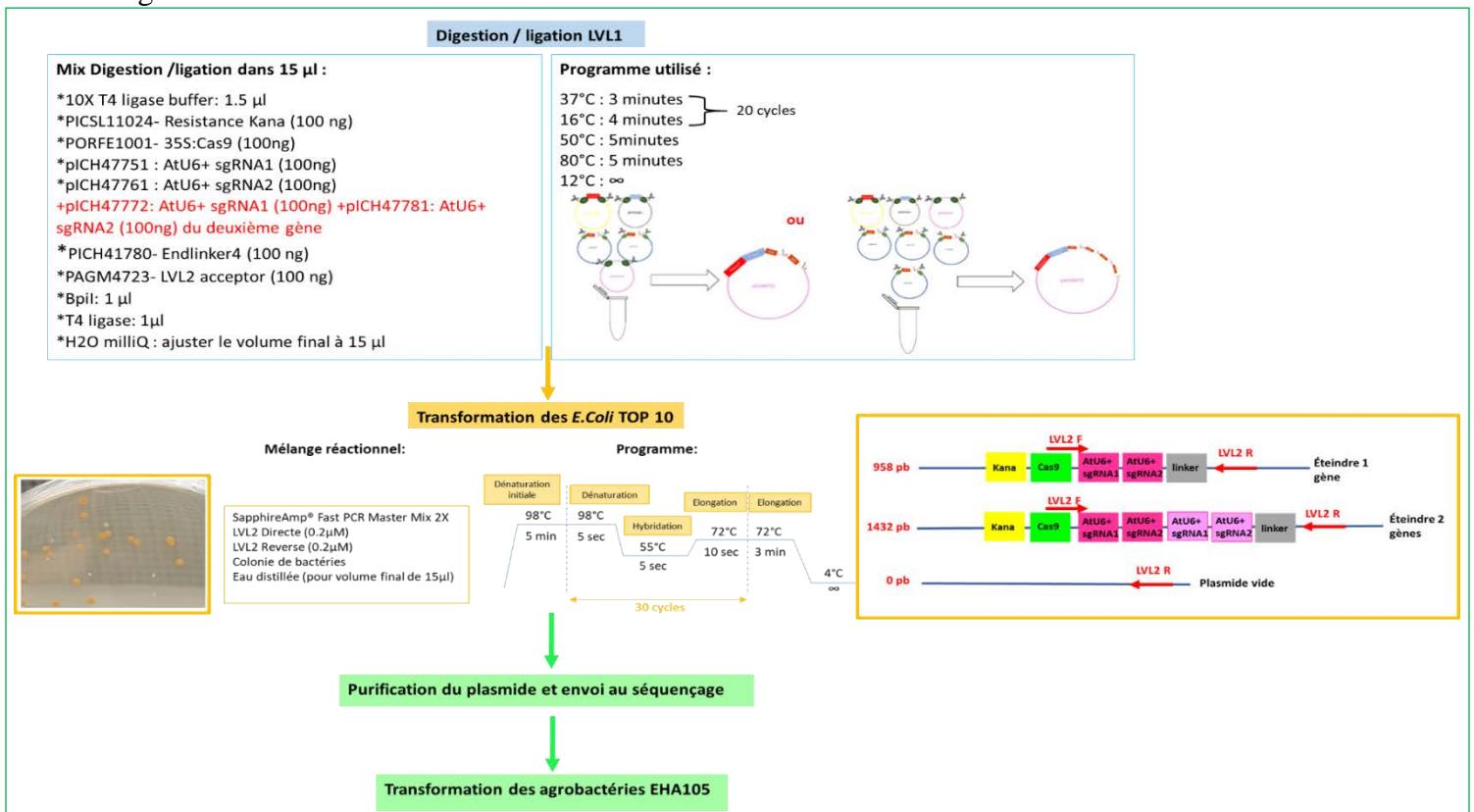
**Figure 41 :** Rassemblement niveau LVL1 Golden Gate. L'étape de digestion/ligation réalisée par les enzymes Bsal/T4 ligase selon le programme et avec les produits représentés figure dans les cadres bleus. L'étape de transformation et de criblage des bactéries est représentée en jaune. La photo de la boîte de Pétri montre les colonies positives en blanc et celles négatives en bleu.

### 3.3.6.Rassemblements dans le plasmide final pAGM4723, niveau 2 (LVL2)

Cette étape représente l'assemblage des différentes unités (gène de résistance+Cas9+ sgRNA 1+ sgRNA 2) dans le plasmide final pAGM4723. Les différentes unités sont rassemblées dans le vecteur final dans l'ordre suivant (RB---LB), le gène de résistance Kana (avec pNOS promoteur et Tnos terminateur), la Cas9 (avec 2X35S promoteur et TOCS terminateur), AtU6+sgRNA1, AtU6+sgRNA2 et enfin une séquence appelée « linker » qui permet au plasmide de se refermer. Dans le cas du vecteur destiné à éteindre deux gènes en même temps, les deux sgRNA de l'autre gène sont ajoutés juste après celles du premier gène.

Avec les produits de digestion / ligation j'ai transformé les aliquots de 50 $\mu$ l de *E. Coli* Top10 (voir **paragraphe 3.5.c du chapitre 2**). Les bactéries transformées sont incubées 1h à 37°C puis étalées sur une boîte de Pétri LB+ kanamycine (50 $\mu$ g/mL). La boîte de Pétri est placée à 37°C pendant 16h. Après 16 h, les colonies positives qui contiennent le vecteur pAGM4723 avec les unités dedans sont de couleurs blanches alors que les colonies négatives qui portent le vecteur pAGM4723 vide sont de couleurs orange (voir **paragraphe 3.2 plasmides**) (**Figure 42**). Un

criblage PCR sur les colonies positives est réalisé en utilisant les amores LVL2 et un prémix, SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 2X (Takara Bio Inc.). Ce prémix contient une polymérase sans activité correctrice. Le programme utilisé pour cette amplification PCR est représenté dans la **Figure 42**. Les colonies positives doivent montrer une bande de taille 958pb alors que les colonies négatives ne montrent pas de bandes sur le gel puisque l'amorce Cas9F s'hybride à une séquence de la Cas9. Les colonies positives sont ensemencées dans 4 mL de LB+ ampicilline durant 16 heures à 37°C/180 rpm. A partir de ces bactéries, la purification et la quantification du plasmide sont réalisées comme décrit dans le **paragraphe 3.3.5**. Quinze  $\mu$ l du plasmide purifié sont envoyés au séquençage avec les amores LVL2 et le reste est conservé à -20°C pour la transformation des agrobactéries.



**Figure 42 :** Rassemblement niveau LVL2 Golden Gate. Dans les cadres bleus : étape de digestion/ligation réalisée par les enzymes BpI/T4 ligases selon le programme et avec les produits représentés. En jaune : étape de transformation et de criblage des bactéries. La photo de la boîte de Pétri montre les colonies positives en blanc et celles négatives en orange. En vert : programme utilisé pour le criblage par PCR des agrobactéries positives.

### 3.3.7. Transformation des agrobactéries avec la construction finale CRISPR/Cas9

Des aliquots de 40 $\mu$ l des agrobactéries électrocompétentes EHA105 sont transformés avec 10 à 50 ng du plasmide pAGM4723+ unités d'intérêt dedans. Les agrobactéries sont déposées dans une cuve d'électroporation et électroporées avec l'électroporateur Micropulseur TM (Biorad) sous

un courant de 2.5 kV. Juste après le choc, 300µl de LB sont ajoutés dans la cuve, puis l'ensemble de la solution est incubé 2 h à 28°C / 180 rpm puis étalée sur une boite de Pétri LB+ kanamycine. La boite de Pétri est placée à 28°C pendant 48 heures. Les colonies d'agrobactéries qui ont poussé, sont sélectionnées par criblage PCR en utilisant les amores LVL2 (**Figure 42**). C'est avec ces colonies d'agrobactéries porteuses des constructions CRISPR / Cas9 dans le plasmide pAGM4723 que les cotylédons de tomate seront transformés.

### 3.4. Transformation et régénération des plantes tomate *in vitro*

#### 3.4.1. Solutions stocks utilisées dans les milieux de culture

J'ai préparé les solutions mères indiquées dans le **Tableau 9** pour les utiliser ultérieurement dans la préparation des différents milieux de régénération des tomates. Les solutions mères sont filtrées en conditions stériles à l'aide des filtres de à 0.2µm puis sont réparties dans des aliquots de 15mL et conservées à l'abri de la lumière à 20°C.

*Tableau 9 : Produits utilisés pour la préparation des milieux*

Produits	Concentration de la solution-mère	Solvant	Fournisseur
<b>Thiamine HCL</b>	<b>10 mg/ml</b>	H2O mQ	Sigma-Aldrich
<b>AIA:</b> acide indole acétique	<b>1mg/ml</b>	EtOH 70%	Sigma-Aldrich
<b>BAP:</b> 6-benzylaminopurine	<b>10mg/ml</b>	H2O mQ +2% NaOH	Sigma-Aldrich
<b>Acétosyringuone:</b> 3',5' - Diméthoxy-4' - hydroxyacétophénone	<b>0,098 mol/L</b>	EtOH 70%	Aldrich Chemistry
<b>kanamycine</b>	<b>150mg/ml</b>	H20 mQ	Duchefa
<b>Timentin:</b> Ticarcillin disodium w/Clavula	<b>150mg/ml</b>	H20 mQ	Toku-E
<b>2,4D :</b> Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	<b>10 mg/ml</b>	EtOH 70%	Sigma-Aldrich
<b>Kinétine</b>	<b>1 mg/ml</b>	H2O mQ +2% NaOH	Sigma-Aldrich
<b>Vitamines de Nitsch</b>	<b>10g/ml (X100)</b>	H2O mQ +2% NaOH	Duchefa
<b>Zéatine:</b> N <sup>6</sup> -isoentényladénine	<b>2 mg/ml</b>	H20 mQ	SIGMA
<b>Vitamines MS:</b> Murashig & skoog vitamins mixture	<b>10g/ml (X100)</b>	H20 mQ	Duchefa

#### 3.4.2. Milieux de régénération

Il existe 6 milieux de régénération *in vitro* des tomates à partir des cotylédons. Ces milieux sont préparés dans des bouteilles d'H<sub>2</sub>O milliQ, dont le pH est ajusté à 5.8 avec du KOH avant d'être autoclavées. Les hormones et les antibiotiques sont ajoutés à la solution une fois les bouteilles refroidies jusqu'à une température d'environ 50°C. Les milieux sont ensuite coulés dans des boites

de Pétri stériles (dans des pots bébé en verre dans le cas de milieu de germination) conservées à l'abri de la lumière à 4°C.

Les milieux sont préparés au maximum 3 jours avant leur utilisation. Le milieu de suspension d'agrobactérie est le seul milieu qui n'est pas solide. Il est préparé et conservé de la même manière sauf qu'il n'est pas coulé dans des boites de Pétri. Dans la mesure où j'ai travaillé sur deux variétés de tomates différentes, il a fallu adapter la composition des milieux de régénération à chacune (**Tableau 10** et **Tableau 11**).

*Tableau 10 : Compositions des milieux pour la culture in vitro de la variété Ailsa Craig*

Substrats	Milieu de germination	Milieu de préculture	Milieu de suspension	Milieu de co-culture	Milieu de régénération	Milieu d'enracinement
Sels MS (Murashig et Skoog)	1,1 g/L	4,41 g/L	4,41 g/L	4,41 g/L	4,41 g/L	2,2 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$		200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L		
MES					700 mg/L	700 mg/L
Agar HP696	8 g/L	8 g/L		8 g/L	8 g/L	7 g/L
Sucrose	15 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	30 g/L	10 g/L
<b>Ajuster le pH à 5,8 avec du KOH et autoclaver avant d'ajouter les hormones / vitamines / antibiotiques préalablement filtrées (0,2<math>\mu\text{m}</math>)</b>						
Thiamine HCl		1 mg/L	1 mg/L	1 mg/L		
Acétosyringone		$2 \times 10^{-4}$ mol/L	$2 \times 10^{-4}$ mol/L	$2 \times 10^{-4}$ mol/L		
2,4D		0.25 mg/L		0.25 mg/L		
kinétine		0.1 mg/L		0.1 mg/L		
Vitamines de Nitsch					100 mg/L	100 mg/L
Kanamycine					100 mg/L	
Timentin					300 mg/L	75 mg/L
Vitamines M.S	12,5 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	50 mg/L
Zéatine					2 mg/L	

*Tableau 11 : Compositions des milieux pour la culture in vitro de la variété WVa106*

Substrats	Milieu de germination	Milieu de préculture	Milieu de suspension	Milieu de co-culture	Milieu de régénération	Milieu d'enracinement
Sels MS (Murashig et Skoog)	1,1 g/L	4,41 g/L	4,41 g/L	4,41 g/L	4,41 g/L	2,2 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$		200 mg/L	200 mg/L	200 mg/L		
MES					700 mg/L	700 mg/L
Agar HP696	8 g/L	8 g/L		8 g/L	8 g/L	7 g/L
Sucrose	15 g/L	20 g/L	20 g/L	20 g/L	30 g/L	10 g/L
<b>Ajuster le pH à 5,8 avec du KOH et autoclaver avant d'ajouter les hormones / vitamines / antibiotiques préalablement filtrées (0,2<math>\mu\text{m}</math>)</b>						
Thiamine HCl		0.9 mg/L	0.9 mg/L	0.9 mg/L		
Acétosyringone		$2 \times 10^{-4}$ mol/L	$2 \times 10^{-4}$ mol/L	$2 \times 10^{-4}$ mol/L		
AIA		1 mg/L		1 mg/L	1 mg/L	
BAP		2 mg/L		2 mg/L	2 mg/L	
Kanamycine					150 mg/L	
Timentin					300 mg/L	75 mg/L
Vitamines M.S	12,5 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	50 mg/L

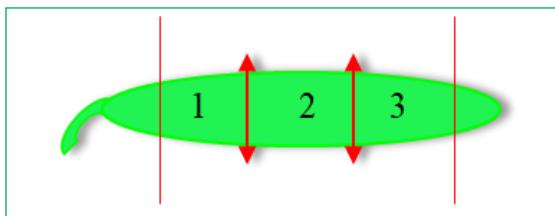
### 3.4.3. Stérilisation des graines

A partir de ce paragraphe jusqu'au paragraphe 4.4.10, tout le travail est réalisé sous une hotte dans des conditions stériles. Le matériel est stérilisé à l'autoclave ou bien à l'aide d'éthanol 70% puis brûlé à la flamme.

Les graines de tomate sont stérilisées avec de l'eau de javel 3% pendant 15 minutes puis rincées à l'eau stérile 2 fois et un dernier lavage de 10 minutes (3 lavages en total). Elles sont ensuite étalées sur le milieu de germination dans des pots bébés en verre incubés pendant 7 jours dans l'armoire climatique à 24°C en lumière diffuse (mi- obscurité).

### 3.4.4. Manipulation des cotylédons

Au bout de 7 jours, les graines ont germé et développé des cotylédons. Les cotylédons sont prélevés en sectionnant la base de l'hypocotyle et déposés sur une surface dure et stérile (l'intérieur d'une boîte de Pétri) pour les découper. Les cotylédons sont découpés en 3 fragments à l'aide d'un scalpel (**Figure 43**). Ces fragments sont disposés dans une boîte de milieu de préculture, face supérieure au contact du milieu, bien à plat. Cette boîte est placée dans l'armoire climatique pendant 24h à 24°C, en lumière diffuse de  $120 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ .



**Figure 43 :** Manipulation des cotylédons. Les deux extrémités sont éliminées côté hypocotyle et côté pointe, puis le cotylédon est coupé en 3 fragments, perpendiculairement à la nervure.

### 3.4.5. Conditionnement des agrobactéries

Au cours du même jour de manipulation des cotylédons, une préculture d'agrobactéries est lancée (dans 10 mL de LB + rifampicine 20mg/L + kanamycine 50mg/L) à partir d'une colonie d'*A. tumefaciens* EHA105 transformés par la construction souhaitée et incubée toute la nuit à 28°C/180 rpm. Le lendemain, une culture (45 mL dans du LB + rifampicine 20mg/L + kanamycine 50mg/L) est lancée à partir de 5 mL de la préculture. Elle est incubée jusqu'à que sa D.O<sub>(600 nm)</sub> soit comprise entre 0,4 et 0,6. Une fois que la culture est à la bonne D.O, elle est centrifugée 10 min à 5000 rpm. Le culot est re-suspendu dans 40 mL de milieu de suspension des agrobactéries et la D.O est re-mesurée. A partir de cette suspension, une solution est formée par dilution (en utilisant du milieu de suspension des agrobactéries) à une D.O de 0,08 (0,05~0,08) dans un falcon (50 mL) stérile à un volume final de 30mL. Cette solution est laissée reposer pendant 15 minutes.

### 3.4.6. Transfection des cotylédons par *A. tumefaciens*

Les cotylédons sont délicatement sortis du milieu de préculture à l'aide d'une pince stérile et déposés dans la suspension d'agrobactéries dans le tube de falcon. Le tube est enveloppé avec du papier aluminium pour assurer l'obscurité à l'intérieur et mis sur une plaque agitante à vitesse faible pendant 30 min. Après 30 minutes d'agitation, les cotylédons sont déposés, à l'aide d'une pince stérile, sur un papier essuie-tout stérile et enroulés délicatement pour éliminer la solution des agrobactéries. Les cotylédons sont ensuite étalés sur le milieu de co-culture en contact avec la gélose *via* la surface supérieure. Ils sont déposés dans l'armoire climatique pour 48h à 24°C.

En raison du nombre de constructions (5 constructions de surexpression et 7 constructions de CRISPR/Cas9, par variété) je transformais chaque semaine une construction en utilisant 50 graines de chaque variété. Ce travail s'est étalé sur 4 mois, entre préparation des milieux, lancement des transformations des nouvelles constructions et repiquage des cotylédons en cours de régénération jusqu'à la finalisation de la transformation de toutes les constructions.

### 3.4.7. Régénération des cotylédons

Après 48h, les cotylédons sont étalés sur le milieu de régénération et déposés dans l'armoire climatique sous éclairage 16h/obscurité 8h à 24°C pendant une semaine. Les fragments de cotylédons sont repiqués sur du milieu de régénération avec une périodicité de 7 jours jusqu'à l'obtention des plantules (petite tige et feuilles) à partir des cals.

### 3.4.8. Préparation des plantules pour l'enracinement

Après plusieurs semaines de régénération (6 à 8 semaines selon la variété utilisée), des tiges avec des feuilles se sont développées à partir des cals. Elles sont récupérées en les coupant à l'aide d'un scalpel stérile (Figure 44). Ensuite, les tiges des plantules se sont enfoncées délicatement dans le milieu d'enracinement dans des pots en verre. Ces derniers sont placés dans l'armoire climatique avec les conditions de 16h/obscurité 8h à 24°C. Les plantules sont repiquées dans des pots bébés en verre toutes les 2 semaines jusqu'au développement des racines et des nouvelles feuilles.

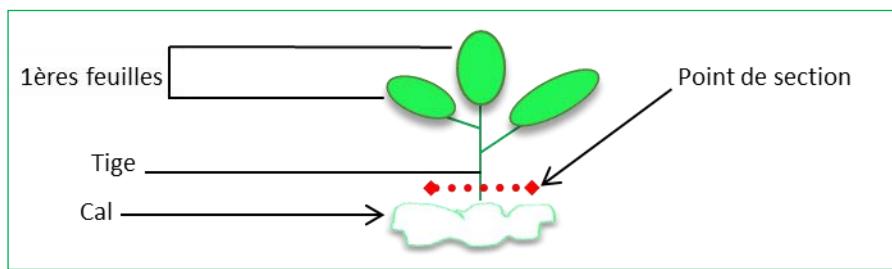


Figure 44 : Séparation de la plantule à partir du cal.

### **3.4.9.Acclimatation et culture des tomates transgéniques**

Une fois que les racines sont bien développées, les plantules sont sorties des pots et rempotées dans du terreau dans une caisse de confinement légèrement ouverte pour leur assurer une bonne humidité (70%) avec les conditions 16h jour/8h obscurité et température 24°C.

Après 3 semaines d'acclimatation, les plantes sont sorties de la caisse de confinement dans un phytotron dédié aux OGM avec les conditions suivantes : 24°C le jour 16°C la nuit, une photopériode de 16 h d'éclairage, humidité relative de 70%, et enfin un apport de fertilisant N, P, K (8%,16%,40%) une fois par semaine.

### **3.5.Identification des plantes transgéniques**

#### **3.5.1.Extraction de l'ADN génomique**

Cent mg de feuilles des plantules régénérées dans les pots en verre sont broyés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon préalablement nettoyés avec de l'éthanol 70%. La poudre obtenue est transférée dans un microtube de 1.5 mL pour extraire l'ADN génomique avec le kit "E.Z.N.A ® SP Plant DNA kit" (Omega Bio-tek, Norcross, GA, États-Unis) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN génomique extrait est stocké à -20°C. j'ai utilisé l'amplification du gène *SiTIP41* (Lacerda et al., 2015b) comme contrôle.

#### **3.5.2.Amplification par PCR (génotypage)**

L'amplification des gènes ciblés à partir de l'ADN génomique des plantes est réalisée avec un prémix de PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 2X (Takara Bio Inc.). Ce prémix contient une polymérase à haute-fidélité. Le génotypage par amplification PCR est réalisé avec un prémix, SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 2X (Takara Bio Inc.). Cette amplification permet de valider l'insertion des constructions de surexpression, et de valider l'insertion des constructions CRISPR/Cas9. Cette dernière se fait en plusieurs étapes ; la première est de vérifier la présence de la séquence codant pour la protéine Cas9 dans le génome des plantes par amplification PCR en utilisant le couple d'amorce 35S prom+cas9. Ces amorces amplifient une séquence de 1134 kb de l'ADN de la Cas9. La deuxième étape consiste à valider l'insertion des séquences codantes pour les sgRNA dans le génome, pour cela j'ai utilisé le couple d'amorce LVL2. En effet dans l'ADN-T inséré dans le génome de la plante, les séquences sgRNA viennent juste après la séquence de la Cas9. Pour cela, l'amorce LVL2 directe s'hybride à la fin de la séquence codante pour la Cas9 et l'amorce LVL2 reverse s'hybride à la fin de la région qui contient les sgRNA (0.946 kb).

### 3.5.3. Clonage dans pCR™8/GW/TOPO™

Les produits PCR obtenus dans le paragraphe 4 .5.2 doivent être envoyés au séquençage pour pouvoir valider la présence d'édition génétique et de savoir le type de mutations qu'elle a engendré. Les plantes générées peuvent être chimériques ; c'est-à-dire que dans une même plante, plusieurs cellules ont pu subir un événement d'édition différent. Alors il y a une forte possibilité que pour chaque amplification du gène pour une même plante, il existe plusieurs allèles. Ainsi, pour envoyer au séquençage il faut séparer les allèles, sinon les profils de séquençages ne seront pas clairs. Pour cela le passage par une étape de clonage dans un plasmide constitue une étape importante dans ma stratégie.

Le clonage dans le plasmide pCR™8/GW/TOPO™ est réalisé en plusieurs étapes comme décrit dans le **paragraphe 3.5 du chapitre 2**. Le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries MC1022 électrocompétentes dans une cuve d'électroporation et électroporées avec l'électroporateur Micropulseur TM (Biorad) sous un courant de 2,5 kV. Juste après le choc, 300µl de LB sont ajoutés dans la cuve. L'ensemble de la solution est ensuite incubé 1h à 37°C puis étalé sur boîte de Pétri LB+ spectinomycine 100mg/L, placée à 37°C pendant 16 heures. Les colonies qui se sont développées sont ensemencées dans 4 mL de LB+ spectinomycine 16 heures à 37°C/180 rpm pour la purification du plasmide avec le kit "NucleoSpin Plasmid" (Macherey-Nagel). Le plasmide élut dans un volume total de 50 µl est quantifié avec le spectrophotomètre Biophotometer (Eppendorf, Hambourg, Allemagne). Quinze µl du plasmide purifié sont envoyés au séquençage.

### 3.5.4. Séquençage

Le séquençage est réalisé par Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, Pays-Bas). Les échantillons séquencés sont les gènes d'intérêts clonés dans le plasmide pCR™8/GW/TOPO™ en utilisant les amorces citées dans le **Tableau 8**. J'ai analysé les résultats du séquençage en utilisant l'outil bioinformatique Bioedit (Tom Hall, Ibis Therapeutics Carlsbad, CA, Etats-unis).

## 4. Résultats

### 4.1. Constructions CRISPR/Cas9

#### 4.1.1. Construction des sgRNA

J'ai construit deux sgRNA par gène pour augmenter l'efficacité de l'édition génétique (**Figure 45**) en utilisant le logiciel crispor, et les critères de sélection décrites dans le **paragraphe 3.3.1**. Au total, j'ai construit 10 sgRNA (2/gène) par amplification PCR (**paragraphe 3.3.2**) à partir du plasmide pICH86966, et en utilisant les amorces mentionnées dans le tableau 10 (**Figure 46**).

#### PHT1:

153... CCCACAT~~CCA~~**CTA**\***TCGAAACGGGACTTCGA**AAGACGTTATCGATTATCGAGAGTGGGCGGGCGAATAGGTGAAGATGAACATGGTAATCGAGGAGTTTCTCAATGATGAGGGTTCGAT  
TCATCGAGGCGTCTGTAGACGCCCTCGTGGACGAAGTATTGCCCTAAAGCCTCTCCCTATGCTCTCCTACATCCTAGTTAAAAGATGAGTGGAGTTAATCCAAGTCCAAGTACACGTTTACAGT  
GTGGCTCTGTTGGTCGGTTACGGGCCACCATGATAGCTGACGGCACGCTGCAAGCAACTTTTGCGTGGGGCGAAGCAGTCGAGGGATGGAATTACACCCA**TCC**\***CGATGAACGAT**  
**CGTGCT**ATTTCCGCCCTCGAAATCCACCCCTAGTCGAGTACAACCATGTTGGGGCGAATTGTCGTCCTAAATTAGTAAACAAAGAGTTAGTCAAAATCAACAGTCAGATAAAGAGAAAAATATCAT  
AGTCACAAAGTCATTAC...642

#### PHT2:

381...ATCCAAGTCCAAGTCACGTTCACGTGTTGCTGTGGTGGTCGGTTACCGGCCACCATATAAGCTGACGGCATGTCGAAGCAACTTTTGCGTGGGTAAGCGTGCAGGCCAG  
GATGGAATTACACCC**CTC**\***CCGGTGAATGACCGA**ACTATTTCCG**CC****TCG**\***GGATCCACCCCTCGTCG**AGTACAACCATGTTGGGCCAATTGTCCTAAATTAGGATAAAGGAGTTAGTCAAAGT  
CAACAAACGATGAA...684

#### PHT3:

149...TCCCACTCCACCA**AAC**\***GCCGCGATTCAATTGGG**GCTTCAAAAGGCCCTAGCGATTACAGGGAGTGGCAGGGCGATTAGGTAAGACGAAAATGGTATTCCAGTAATTGCTCAATGATGAA  
GGTGTGATTGAGGATCAGGGATAGTACCCCTGATAAAAGTTATGCCCTTAACCTCCGCTTGTCTTAACATCCT**CGC**\***TTGAACAATGTGGTCG**A GTTGGTGCAAGTTCAAGTC...9  
33

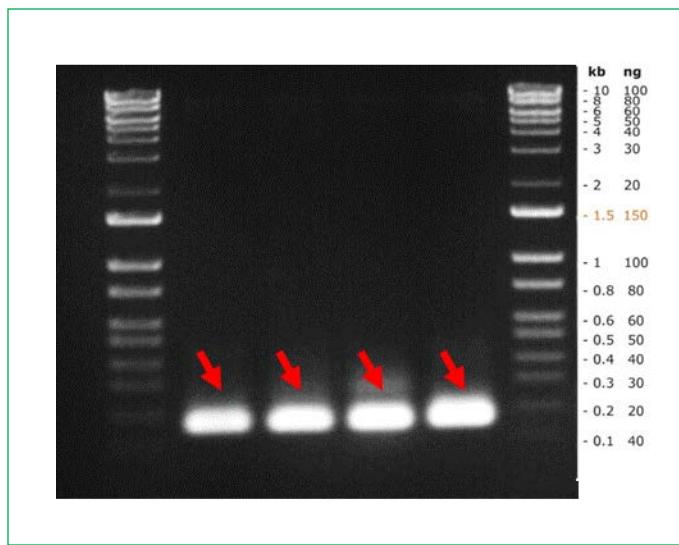
#### PHT4:

320...TTCAAGCCTCGCCTCTTGCTTAGCCTACATCCTAGCTGAAGGATGTCAAAGAATTGGTCAAGTCCAATTAACTAGGTTACTGTGGCT**CCT****TTAG**\***TGGTGGTTTACCGCGC**\***ACACAC**  
**GGTAGCAGACGGTC**ATTCAACTAGCAACTCTGGTTGCAAGCTGCGAGGCCCTAAAGTCATCCTCTTGTGATCGTAGTATTTCACCCACGAAAT...759

#### Solyc06g083900.2:

80...CTTGCTGTGAGAAATTGGGGTTGAAAGAGGTGATGGAGCAAAGAAGAAGATTATTACTCATCAATTACATTAAAAGAATGGT**CATCCT****AAT**\***TGGCGTGCAC**TTCAAACACTG**CAGGTCTA**\*  
**TTAAGGTGCGGAAAGTGTAGGCTCGATGGACTAATTACTGAGACCTGATATAAGCGAGGAATTACTCATCAAGAAGAGATAAATTATCAAGTTGATCAAGTTC...517**

**Figure 45 :** Les séquences ciblées par sgRNA pour chaque gène. En jaune les séquences ciblées, en gris le motif PAM, l'astérisque rouge montre le site de coupure de la cas9 dans le gène, et en vert le nombres de nucléotides du gène, non représentées dans la figure.

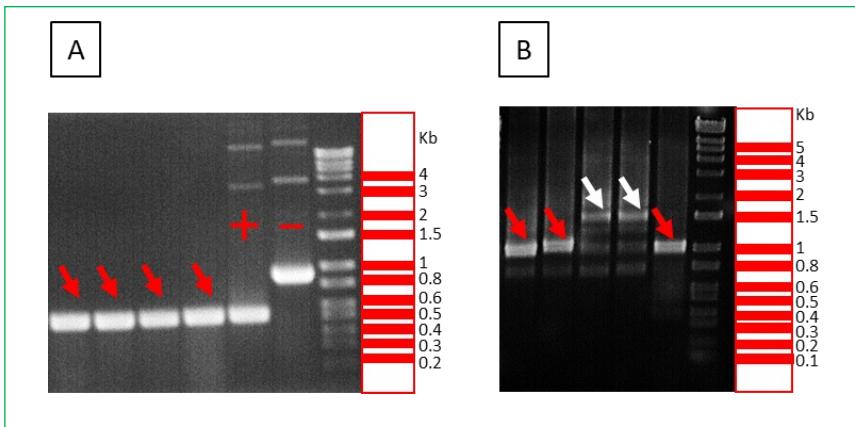


**Figure 46 :** Photo du gel d'agarose des sgRNA, les résultats révèle des bandes de 165pb attendus.

#### 4.1.2.Rassemblement Golden Gate

J'ai réalisé les rassemblements Golden Gate en deux étapes (LVL1 et LVL2) comme décrit dans le **paragraphe 4.3.3 (Figure 47)**. J'ai obtenu en final des plasmides qui me permettent soit d'éteindre un gène ou bien 2 gènes en même temps (**Tableau 12**). Pour rappel, l'extinction du gène

*solyc06g083900.2* me permettra d'obtenir des lignées de tomate qui n'expriment pas le facteur de transcription *solyc06g083900.2*, potentiellement impliqué dans l'accumulation de phénolamides.



**Figure 47 :** Rassemblement Golden Gate. A: Rassemblement LVL1, photo du gel qui montre la taille des bandes des constructions positives LVL1 positives de 521 pb comparées à un témoin positif (vecteur séquencé avec sgRNA dedans marqué en +) et un témoin négatif (le vecteur LVL1 vide marqué en -). B: Rassemblement LVL2, photo du gel qui montrer la taille des bandes des constructions positives à 2 sgRNA (958 pb flèches rouges), et la taille des bandes des constructions LVL2 à 4 sgRNA (1432 pb flèches en blanches).

Pour créer des lignées de tomate qui n'accumulent pas de la CP, il faudrait théoriquement construire un plasmide permettant d'éteindre les quatre gènes *SIPHT* en même temps, ce qui signifie un plasmide contenant 8 sgRNA. La probabilité d'éteindre 4 gènes en même temps est très faible et est impossible avec ce système de rassemblement. Ainsi, l'alternative est de faire les constructions qui permettent d'éteindre d'un côté les gènes *SIPHT1/SIPHT2* et de l'autre côté *SIPHT3/SIPHT4*. Le choix des couples de gènes est basé sur l'analyse spatiale de l'expression de ces gènes (travaux du laboratoire pas encore publiés). Ainsi *SIPHT1* est principalement exprimé dans les tiges, les fleurs et un peu dans les fleurs, alors que *SIPHT2* est très faiblement exprimé dans la plante saine. En revanche ces deux gènes sont très fortement induits par l'herbivorie de *T. absoluta* et une infection par *Pseudomonas syringae* générant une forte accumulation de CP dans les tissus. Ces deux gènes se trouvent sur le même chromosome 11 et ne diffèrent que de quelques nucléotides. Le gène *SIPHT3* est exprimé dans les fleurs et les racines, alors que *SIPHT4* seulement dans les racines. Ainsi, l'extinction du couple *SIPHT1/SIPHT2* permettrait de limiter l'accumulation de CP dans les tiges et les feuilles de la plante et en réponse à un stress biotique, alors que l'extinction du couple *SIPHT3/SIPHT4* limiterait l'accumulation de cette molécule dans les racines et les fleurs.

Tableau 12 : Les différentes constructions CRISPR/Cas9

Symbol de la construction	Gène ciblé
AB	SIPHT1
CD	SIPHT2
EF	SIPHT3
GH	SIPHT4
IJ	solyc06g083900.2
ABCD	SIPHT1+SIPHT2
EFGH	SIPHT3+SIPHT4

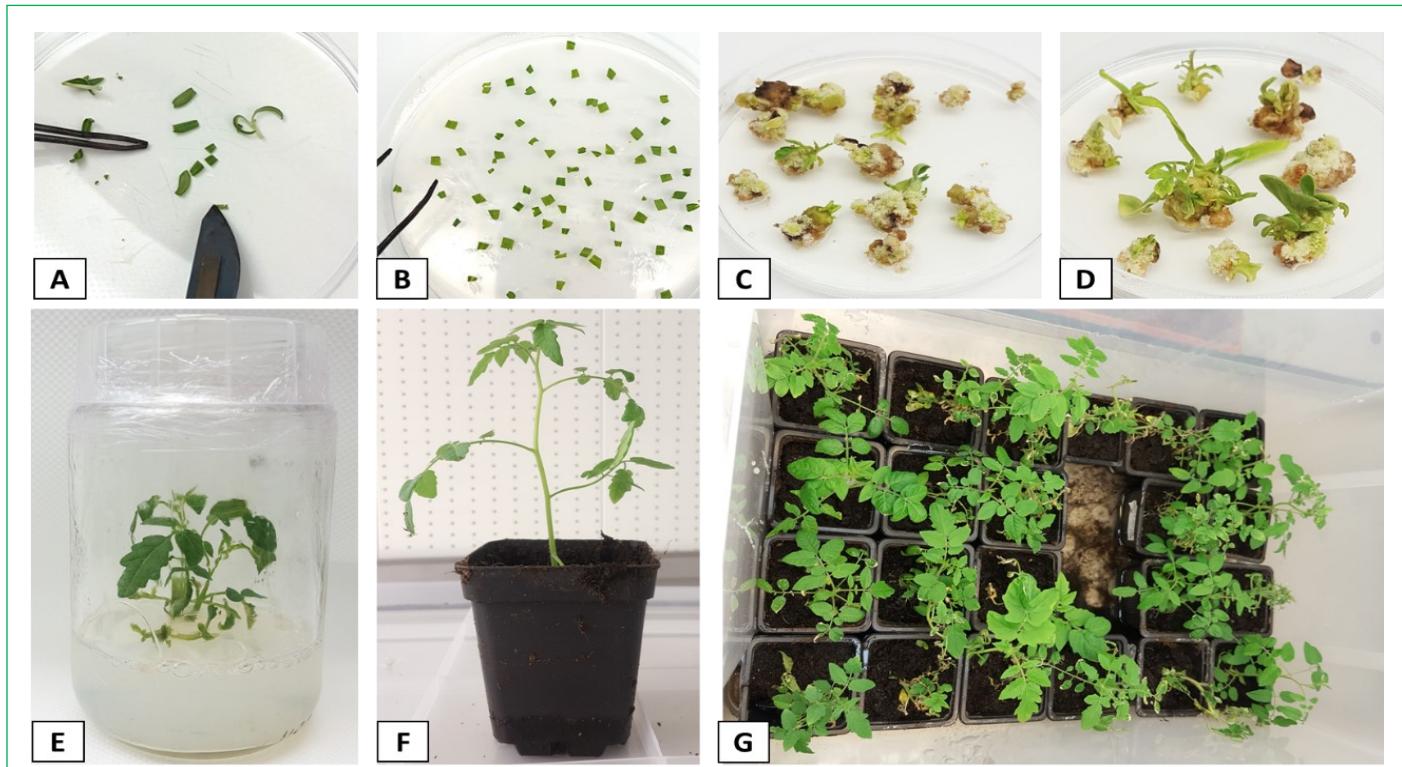
#### 4.2. Transformation et régénération des tomates à partir des cotylédons

J'ai transformé des agrobactéries EHA105 à partir des constructions de surexpression dans pGWB2 et les constructions CRISPR/Cas9 dans pAGM4723. J'ai utilisé ces bactéries pour transformer les cotylédons des deux variétés de tomate *WVa106* et *Ailsa Craig*. Le choix a été fait d'utiliser deux variétés en parallèle afin d'optimiser les chances de succès de ce protocole de transformation qui n'était alors pas maîtrisé au laboratoire. J'ai créé d'une part 5 lignées de tomate qui surexpriment *SIPHT1*, *SIPHT2*, *SIPHT3*, *SIPHT4*, *solyc06g083900* en plus d'une lignée témoin transformée par le vecteur pGWB2 vide. J'ai créé, d'autre part, 7 lignées de tomates éditées génétiquement par la CRISPR/Cas9 pour éteindre chaque gène individuellement et aussi pour éteindre le couple de gènes *SIPHT1+SIPHT2*, *SIPHT3+SIPHT4*.

La vitesse de régénération de la variété *WVa106* (7 à 8 semaines) est beaucoup plus rapide que celle de la variété *Ailsa Craig* (10 à 12 semaines). *Ailsa Craig* présente plus de difficulté de régénération du fait de la perte de constructions et du temps nécessaire pour optimiser le protocole et obtenir des plantules de cette variété. En effet, *Ailsa craig* a montré un retard dans la formation des cals par rapport à *WVa106* et un brunissement de ces derniers. J'ai résolu le problème en augmentant la concentration de thiamine-HCl (de 0.9mg/L à 1mg/L) dans le milieu, en diminuant la concentration de kanamycine (de 150 mg/L à 100mg/L) ainsi qu'en raccourcissant le temps de co-culture de 48h à 24h. Ceci m'a permis d'obtenir les cals des constructions *SIPHT1*, *SIPHT2*, *solyc06g083900.2* en surexpression, et les constructions *SIPHT1* et *SIPHT3* en CRISPR/Cas9 de cette variété. Pour la variété *WVa106*, j'ai obtenu les cals des constructions *SIPHT1*, *SIPHT2*,

*S/PHT3*, *S/PHT4* en surexpression et en CRISPR/Cas9, en plus de construction *S/PHT3+ S/PHT4* en CRISPR/Cas9.

La majorité des tiges formées à partir des cals des différentes constructions avaient des phénotypes normaux et similaires ; une petite tige avec quelques feuilles et un méristème apical (**Figure 48**).



**Figure 48 :** Régénération des tomates à partir des cotylédons in vivo. A : Coupure des cals en 3 fragments. B : Cotylédons étalés dans le milieu de pré-culture. C : Formation des cals et début de feuilles. D : Formation des tiges et des feuilles à partir des cals. E : Plantule au bout de trois semaines dans le milieu d'enracinement. F : plantule transgénique sortie en première semaine d'acclimatation. G: Plantules transgéniques en troisième semaine d'acclimatation.

Dans de rares cas, j'ai observé des tiges avec des malformations : certaines ne portaient qu'une seule feuille en absence de méristème apical, d'autres, des tiges et des feuilles sans pigmentation, d'autres encore une tige portant des feuilles blanches et vertes (**Figure 49**). La formation des tiges blanches était souvent accompagnée d'un brunissement du cal et la mort de cette tige. Seules les tiges avec méristèmes apicaux verts ont été sélectionnées et transférées vers le milieu d'enracinement. Les cals de la construction CRISPR/Cas9 du gène *solyc06g083900* a pris beaucoup de temps pour former des tiges (8 à 9 semaines) pour des deux variétés de tomate.

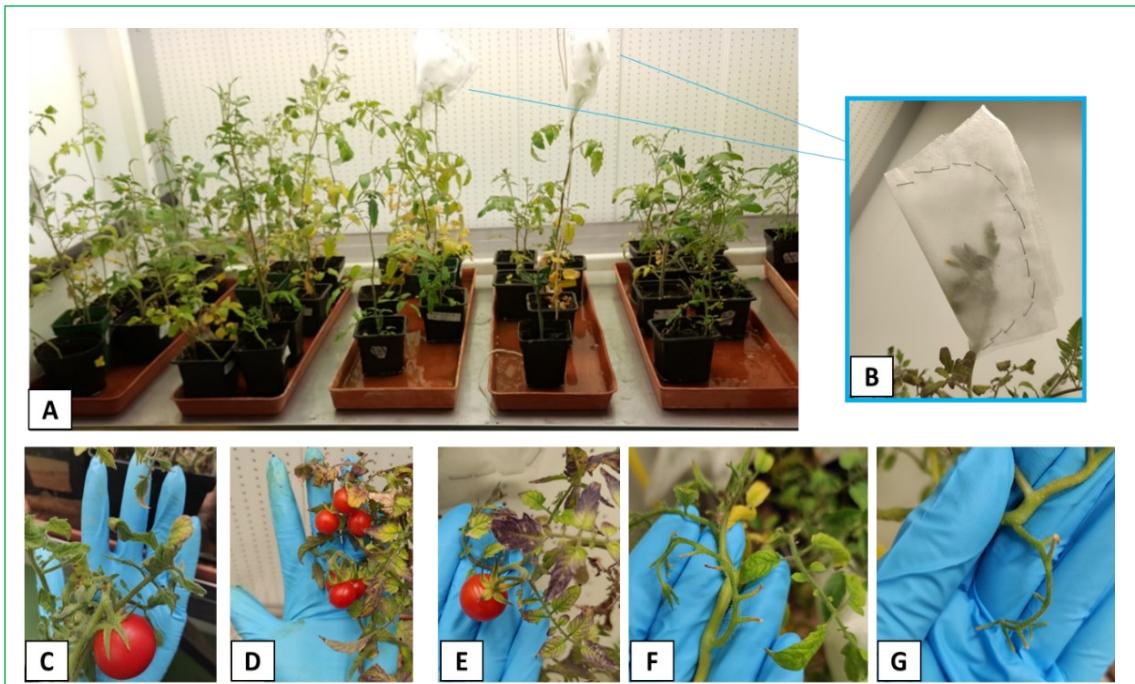


**Figure 49 :** Explants avec des malformations in vitro. A: Feuille unique sans méristème apicale. B: Tige verte avec des feuilles vertes et blanches. Tiges blanches avec des feuilles vertes et jaunes. Explant complètement blanc qui commence à mourir.

Le temps d'enracinement s'est avéré être le même pour les deux variétés et s'étalait entre 8 et 10 semaines. Pendant cette période les plantules formaient des nouvelles feuilles vertes, les vieilles feuilles devenant jaunes et tombant. De plus, certaines tiges ont développé des racines à plusieurs endroits. Une fois rempotées dans le terreau, les plantules ont formé des nouvelles feuilles vertes et développé des nouveaux méristèmes au bout d'une semaine d'acclimatation dans la caisse de confinement. Certaines tiges présentaient des racines à différents endroits en plus des feuilles pendant la phase d'enracinement. Une fois sorties de leurs pots et rempotées dans le terreau, seules les racines à la base de la tige persistaient alors que les autres se desséchaient sans impacter la croissance de la plante. Les plantules de la construction solyc06g083900.2 en CRISPR/Cas9 ont présenté des difficultés de développement et sont mortes.

#### 4.3. Culture des plantes transgéniques dans le phytotron

Les plantes rempotées dans du terreau sont mises en culture dans un phytotron dédié pour les OGM, dans les conditions citées dans le **paragraphe 3.4.10**. Le taux d'avortement des fleurs s'est avéré élevé ; aucune, une seule ou deux fleurs persistaient par bouquet (Figure 50). Les bouquets floraux sans sac à pollen avortaient aussi, ainsi que les fleurs des tomates témoins et sauvages (WT) des deux variétés. Les plantes ont présenté certains phénotypes de stress, avec des petites feuilles jaunes, et des colorations violette sur d'autres feuilles. Le taux d'avortement a diminué avec la succession de génération des bouquets floraux : la moitié des fleurs persistaient d'un bouquet, avec dans quelques cas une seule fleur avortée. Les plantes se sont ensuite développées normalement (croissance, formation des nouvelles vertes feuilles et ramifications) (Figure 50).



**Figure 50 :** Culture des plantes transgéniques dans le phytotron. A : Plantes 3 mois après la sortie des pots bébés. B : Sac à pollen. C : Ailsa Craig qui porte un fruit. D : WVa106 avec des feuilles stressées. E : Phénotype violet des feuilles stressées. F et G : avortement des fleurs.

#### 4.4. Identification des plantes T0 transgéniques

##### 4.4.1. Génotypage par PCR des plantes transgéniques de surexpression

Suite aux travaux de transformation et régénération des plantes qui surexpriment les gènes ciblés, j'ai obtenu 52 plantules en enracinement. Pour vérifier l'insertion de l'ADN-T dans les plantules T0 régénérées, j'ai réalisé un génotypage par amplification PCR (**paragraphe 4.5.2**), en utilisant les amores dans le **tableau 10**. Ce génotypage se base sur la détection de l'insertion du promoteur 35S plus l'ADNc du gène ciblé (ADN-T), et cela en réalisant des amplifications PCR avec une amorce qui cible une séquence du début du promoteur et une amorce qui cible une séquence de la fin de l'ADN du gène ciblé (**Figure 51**).

Pour valider l'extraction d'ADN génomique, j'ai amplifié le gène de ménage *SiTIP41* (taille 1.1 kb) (**Figure 52**, partie A). Parmi ces plantules, 48 présentaient le promoteur 35S en plus de l'ADNc du gène ciblé dans leur génome (**Figure 52**, partie B et C), ce qui est équivalent à une efficacité de 92,3%.

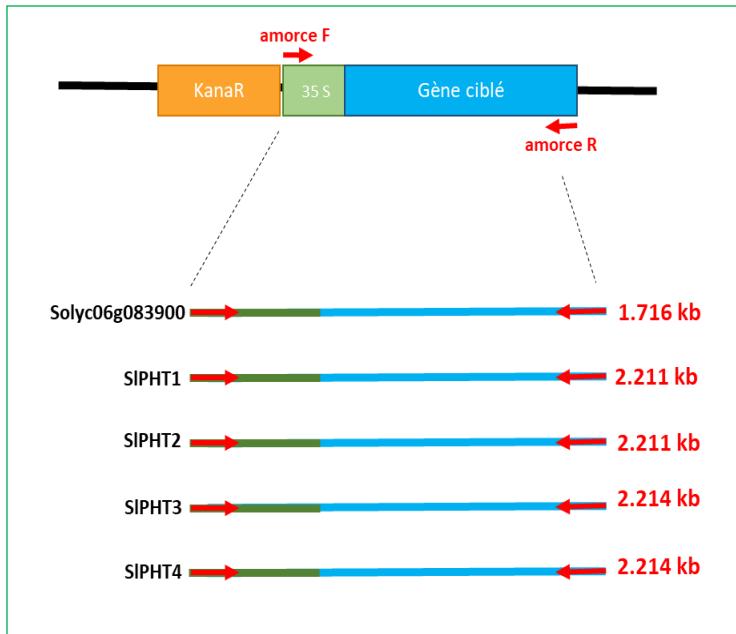


Figure 51 : Représentation de l'hybridation des amorce par rapport au T-DNA inséré dans le génome de la plante et la taille des bandes attendues par rapport à chaque gène ciblé.

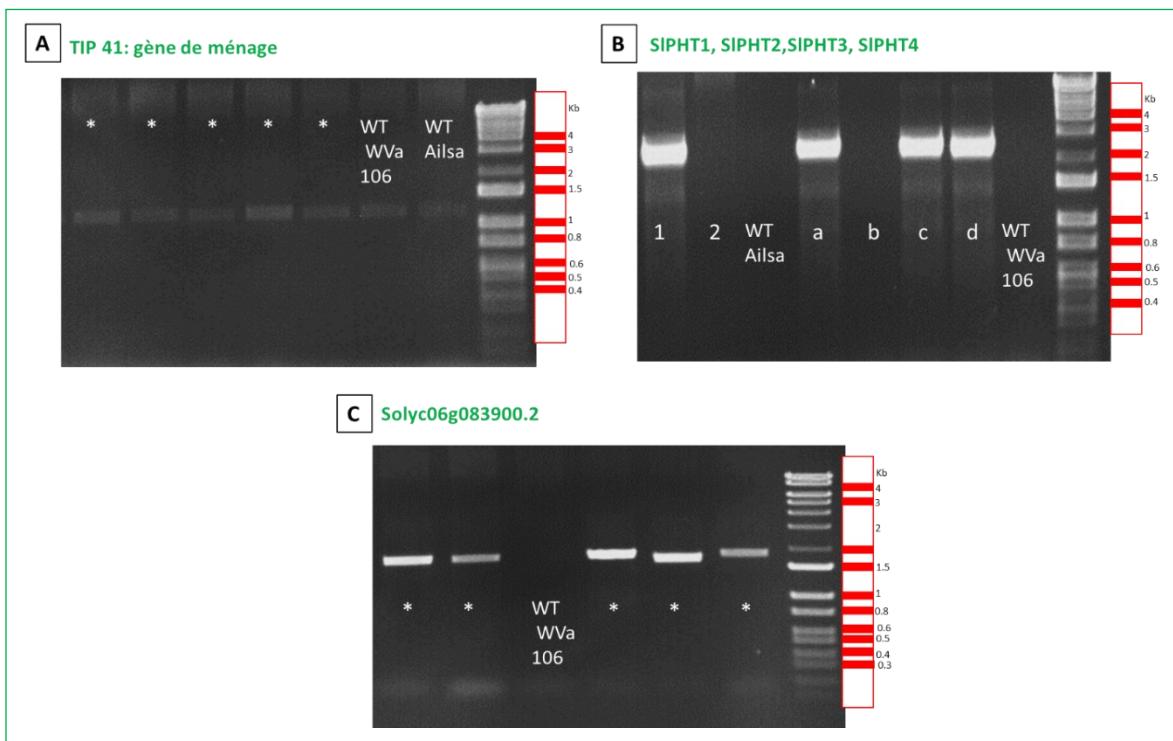


Figure 52 : Génotypage par PCR des tomates transgéniques qui surexpriment les gènes ciblés. A: Amplification par PCR pour le gène de ménage TIP41 sur de l'ADN génomique de différentes plantes issues de culture in vitro (\*) et sur de l'ADN génomique de WT (Wild Type) WVa106 et Ailsa craig. Ce gel permet de valider l'extraction de l'ADN génomique. B: Amplification par PCR sur le gène SIPHT1 pour deux plantes Ailsa craig issues de culture in vitro comparé à du WT. La plante 1 est transgénique alors que la 2 non puisqu'elle n'a pas l'ADN cherché dans son génome. Les plantes a,b,c, et d sont issues de la culture in vitro variété WVa106. La plante a est transgénique pour le gène SIPHT2, la plante b n'est pas transgénique, la plante c transgénique pour le gène SIPHT3 et d transgénique pour le gène SIPHT4. C : Amplification par PCR du gène solyc06g083900 sur l'ADNg des plantes transgéniques Wva106 (\*) en comparant avec WT.

La répartition des plantes transgéniques selon le gène qu’elles expriment est représenté dans le **Tableau 13**. Pour chaque construction, les plantules sont issues d’au moins 6 cals différents, la majorité de ces plantes sont de la variété WVa106 (**Tableau 13**). Les 48 plantules sont réparties sur les différentes constructions comme représenté dans le **Tableau 13**.

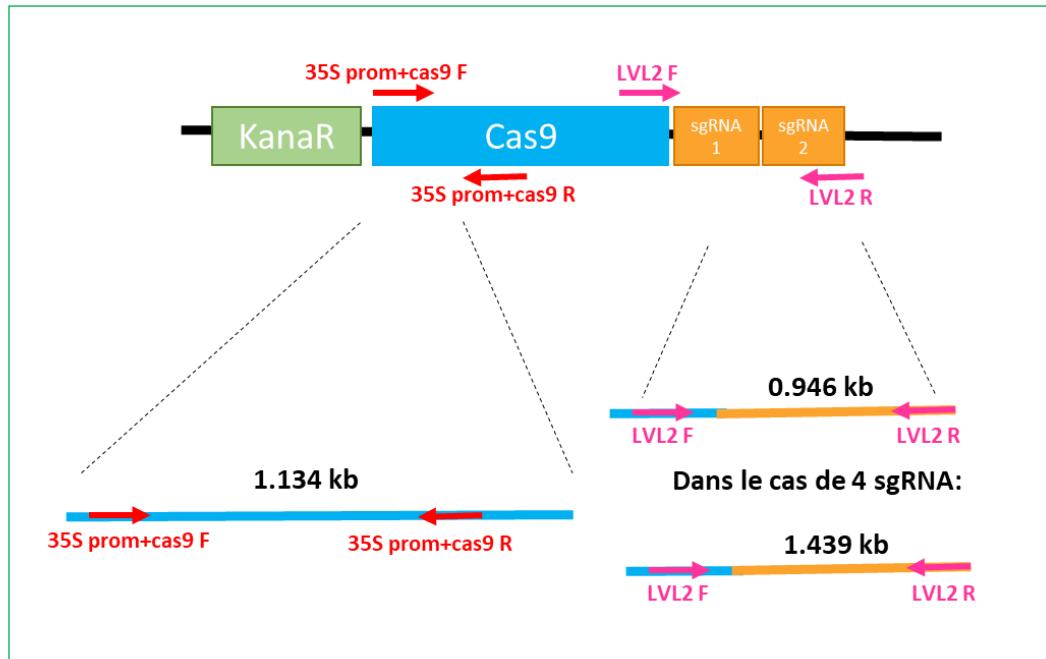
*Tableau 13 : Plantes transgéniques régénérées pour la surexpression*

gène	Nombre de plantes	Variété	Nombre de cals
<b>SIPHT1</b>	<b>3</b>	Ailsa Craig	3
	<b>4</b>	WVa106	3
<b>SIPHT2</b>	<b>3</b>	Ailsa Craig	3
	<b>5</b>	WVa106	4
<b>SIPHT3</b>	<b>7</b>	WVa106	6
<b>SIPHT4</b>	<b>9</b>	WVa106	7
<b>solyc06g083900</b>	<b>3</b>	Ailsa Craig	3
	<b>8</b>	WVa106	6
<b>Contrôle</b>	<b>6</b>	WVa106	6

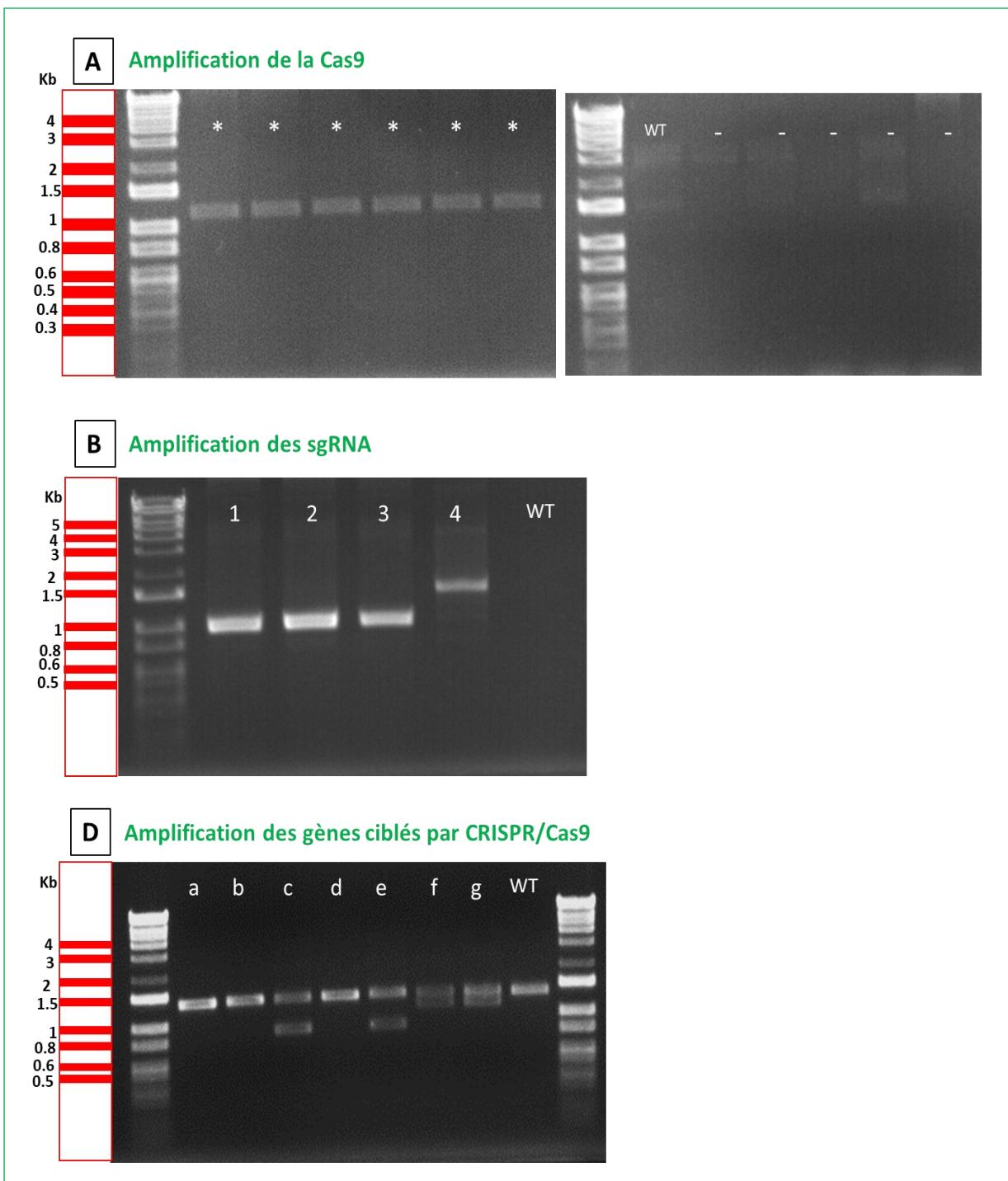
#### 4.4.2. Génotypage par PCR des plantes transgéniques CRISPR/Cas9

Dans le cas des plantes issues de la transformation avec les constructions CRISPR/Cas9, nous avons obtenu au total 57 plantules. J’ai réalisé l’extraction de l’ADN génomique à partir de 100 mg de poudre de feuilles de chaque plante et j’ai validé l’extraction en amplifiant par PCR du gène *STIP41*. J’ai suivi les étapes décrites dans le **paragraphe 3.5.2** pour sélectionner les plantes qui ont bien intégrés les Cas9 et les sgRNA dans leurs génomes (**Figure 53**). Parmi les 57 plantules, 46 avaient la Cas9 dans leur génome, c’est-à-dire ; 80.7% des plantes T0 générées portaient la Cas9. La présence de la Cas9 est essentielle puisqu’elle représente les ciseaux moléculaires permettant de couper le gène. Les 46 plantes qui contenaient la Cas9 dans leur génome contenaient aussi les sgRNA (**Figure 54**). Après avoir confirmé l’insertion des constructions CRISPR Cas9 dans le génome des plantes, j’ai réalisé une amplification par PCR pour détecter les mutations en utilisant les amorces de chaque gène (**Tableau 8**). Parmi les 46 plantules, 35 ont montré deux bandes ; une de la taille du gène ciblé et l’autre de taille différente (plus petite). Ce résultat indique qu’il y a eu délétion d’un allèle du gène (ce qui correspond à la bande de taille inférieure) alors que l’autre allèle du gène peut n’avoir subi aucune mutation ou bien avoir subi des délétions mineures ou des insertions qui ne sont pas détectable par migration sur gel (**Figure 54**). Onze plantes ont

montré un profil de la même taille du gène ciblé (**Figure 54**), indiquant une absence de mutation, ou bien la présence d'une mutation ponctuelle ou encore l'insertion ou la délétion de seulement quelques nucléotides que l'analyse sur gel d'agarose ne permet pas de déceler.



*Figure 53 : Hybridation des amorces par rapport au T-DNA CRISPR/ Cas9.*



**Figure 54 :** Génotypage par PCR des tomates transgéniques pour les constructions CRISPR/Cas9. A : Amplification de la cas9 dans les plantes transgéniques issues de la culture (\*), comparé à des plantes issues de la culture in vitro qui n'ont pas intégré la séquence de la Cas9 dans leur génome (-). B : Amplification de la construction sgRNA dans différentes plantes transgéniques. Les plantes 1, 2, et 3 contiennent 2 sgRNA dans leur génome, la plante 4 contient 4 sgRNA dans son génome. C : Amplification du gène *SIPHT4* à partir des plantes transgéniques. Les plantes a, b, et d présentent des profils identiques au profil d'une plante non transgénique (WT). Les plantes c, e, f et g montrent un profil de mutation où une bande est inférieure à la taille du gène et l'autre bande est identique à ce dernier.

Les 46 plantules sont réparties sur les différentes constructions comme représenté dans le **Tableau 14**.

*Tableau 14 : Plantes T0 transgéniques régénérées pour la CRISPR/Cas9*

gène	Nombre de plantes	Variété	Nombre de cals
SIPHT1	4	Ailsa Craig	3
	9	WVa106	9
SIPHT2	9	WVa106	8
SIPHT3	3	Ailsa Craig	2
	6	WVa106	5
SIPHT4	10	WVa106	9
SIPHT3+ SIPHT4	5	WVa106	5

A ce stade, on ne peut pas en savoir plus sur les types de mutations créés. Pour le savoir, j'ai amplifié les régions ciblées à partir de l'ADN génomique des 46 plantes en utilisant les amorces du **Tableau 8**. Ces amorces permettent d'amplifier la région qui entoure les sites d'hybridation de part et d'autre des deux sgRNA pour chaque gène ciblé (**Figure 55**). Ensuite je les ai clonés dans le vecteur pCR™8/GW/TOPO™ pour le séquençage. J'ai transformé des bactéries MC1022 avec ces vecteurs, et j'ai sélectionné 8 colonies au hasard parmi celles qui se sont développées, j'ai purifié leurs plasmides envoyés au séquençage avec les amorces du **Tableau 8**.



*Figure 55 : Amplification par PCR pour le séquençage. En vert : les régions ciblées par les sgRNA du gène, et où la cas 9 coupe à l'endroit où la mutation aura lieu. En bleu : les régions d'hybridation des amorces utilisées pour entourer de part et d'autre la région mutée.*

#### 4.4.3. Identification de mutation créé par séquençage

Pour chaque plante T0 j'ai envoyé au séquençage 8 échantillons. Les résultats de séquençage ont montré qu'il existe en général au moins 4 allèles différents pour le gène ciblé dans une même plante T0. En fait, parmi les 46 plantes CRISPR/Cas9, la majorité étaient chimériques

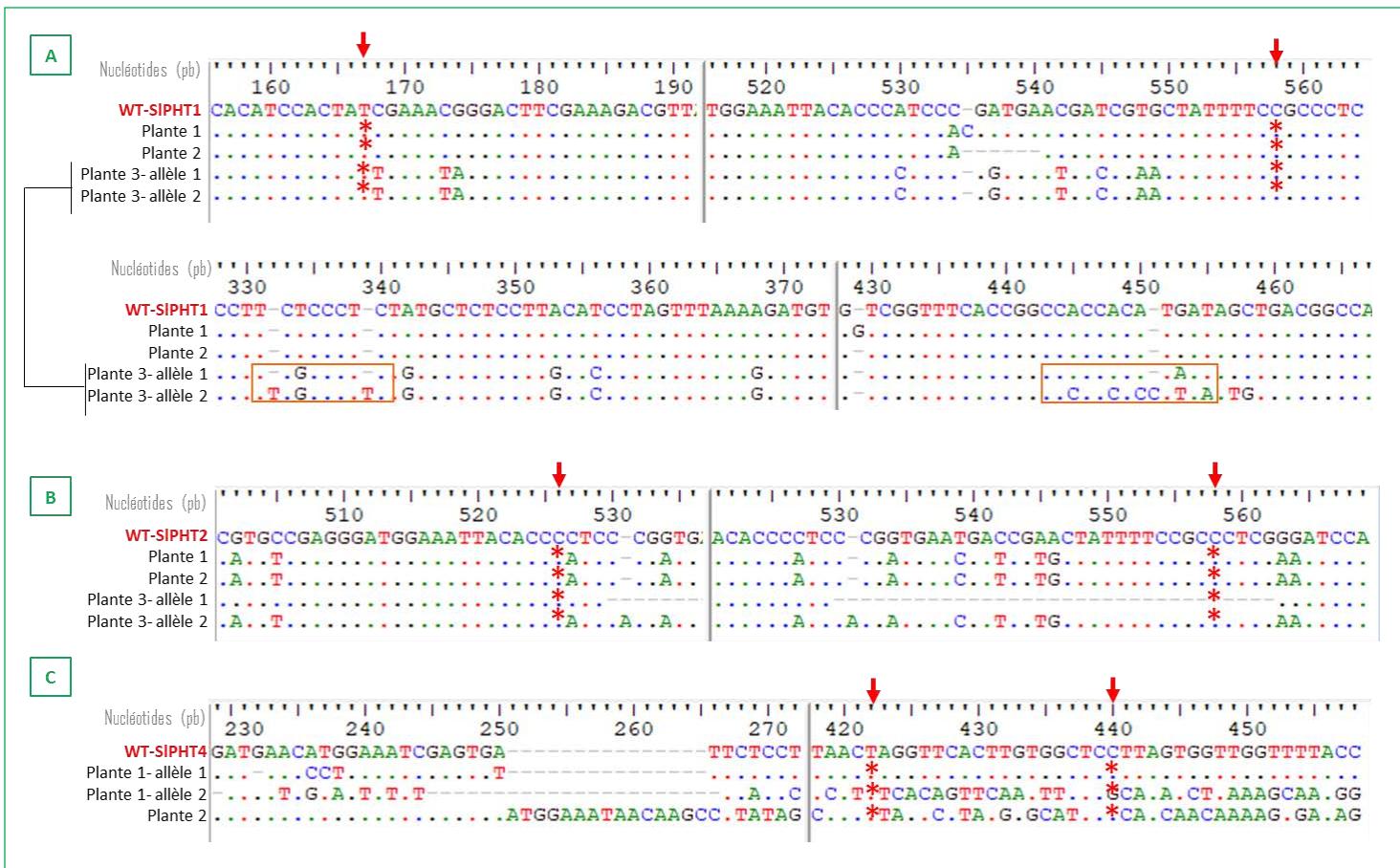
(elles présentent plus de 4 allèles différents par gène ciblé). Par contre, je n'ai pas trouvé chez ces plantes chimériques, un allèle sauvage parmi les 8 échantillons (**Tableau 15**).

*Tableau 15 : Types de plantes T0 régénérées par édition génétique*

Nombres de plantes T0 CRISPR/Cas9	Type de plantes		Nombre d'allèles différents par plante/ nombre d'allèle envoyés au séquençage par plante	Présence d'allèle sauvage
	Description	nombre		
46	chimériques	26	>4 / 8	non
	Hétérozygotes	17	3 ou 4 / 8	1
	Non éditées	3	2/8	2

Les éditions génétiques qui ont eu lieu étaient majoritairement sous forme de indels (insertion/délétion de bases), notamment des insertions, en plus de substitutions (remplacement d'une base par une autre) (**Figure 56**). En plus l'édition génétique ne se limitait pas au site de coupure de la Cas9, mais plutôt elle s'étalait sur plusieurs nucléotides entre les deux sites de coupure (**Figure 56**). Dix-sept plantes T0 étaient hétérozygotes, c'est-à-dire qu'elles avaient un allèle sauvage non édité (WT, Wild Type) et un autre (parfois deux autres) édités (**Tableau 16**). Ensuite 3 plantes ne présentaient aucune édition génétique, le gène était impact, et exactement comme celui des plantes WT. Ces 3 plantes ont été jetées.

Les résultats du séquençage ont montré aussi, pour 6 plantes sur 8, que les sgRNA du gène *SIPHT1* ne sont pas hybrides au gène *SIPHT2* ni l'inverse, malgré la forte homologie entre ces deux gènes (ils ne diffèrent que par quelques nucléotides) puisque les éditions génétiques ont eu lieu dans des endroits différents entre les deux gènes. Par rapport à la construction CRISPR/Cas9 *SIPHT3+SIPHT4*, les résultats ont montré que l'édition génétique a eu lieu dans 4 plantes au niveau des deux gènes, alors que seule une plante a été modifiée sur un seul gène (*SIPHT4*). Chacune de ces 4 plantes avaient différents allèles du même gène qui ne ressemblaient pas à l'allèle sauvage (WT).

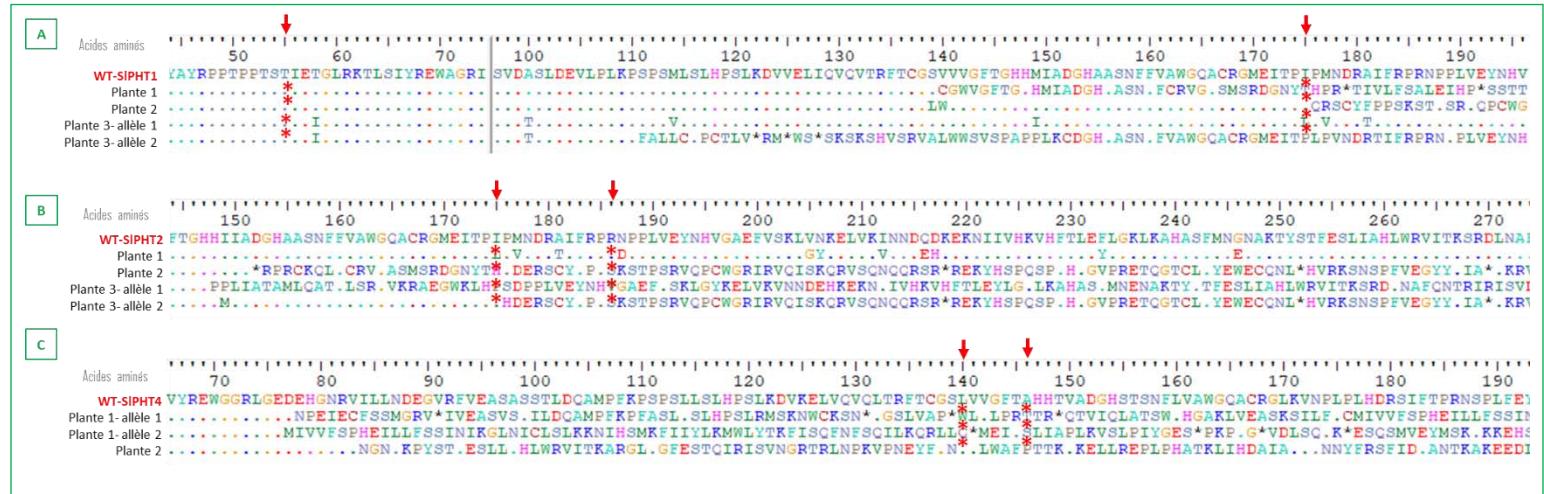


**Figure 56 :** Quelques résultats de séquençage des plantes T0. Les gènes sont alignés et comparés à chaque fois au gène WT (Wild Type) non édité grâce à l'outil bioinformatique « Bioedit ». Chaque base est codée par une couleur spécifique. Les bases identiques à celles du WT, sont en désignées par des points avec la couleur correspondante de chaque base. Le « - » indique une délétion dans les allèles des plantes transgéniques, alors que dans le WT le tiret indique une insertion de base à ce niveau dans un des allèles des plantes T0. La flèche et les astérisques rouge indiquent le site de coupure de la cas9.

A : Trois plantes transgéniques ayant allèles différents du même gène ciblé SIPHT1. Ces allèles sont édités dans la région autour des sites de coupures de la cas9. Ici l'allèle 1 et 2 de la plante 3 paraissent identiques. En cherchant dans toute la séquence des allèles édités de la plante 3, l'allèle 1 et 2 sont finalement différents, puisqu'ils n'ont pas les mêmes éditions génétiques (les différences sont encadrées en orange). B : Plantes transgéniques pour le gène SIPHT2. L'allèle 1 de la plante 3 présente une importante délétion de 32 bases entre les deux sites de coupe de la cas9. C : Plantes transgéniques pour le gène SIPHT4, des éditions génétiques avant les sites de coupe de la cas9 sont visibles pour les 2 plantes.

Après avoir identifié les types d'éditions génétiques dans chaque plante, j'ai cherché pour chaque édition de nucléotides, le changement qu'elle engendrait par rapport à la séquence protéique correspondante en comparant avec la séquence protéique WT (Figure 57). Les résultats ont montré que, dans 71% des cas, il y a eu une modification du cadre de lecture et insertion de codons STOP (Figure 57) indiquant la production d'un peptide non fonctionnel. Dans 29% des cas, la mutation protéique était plutôt de type de substitution d'un acide aminé par un autre (Figure 57). Cette

mutation peut engendrer une modification dans l'activité de l'enzyme ou pas. Le **Tableau 16** permet de voir les types de mutations générées en fonction des constructions.



**Figure 57 :** Quelques résultats de comparaison de séquences protéiques entre les allèles édités et l'allèle sauvage (WT). Les séquences d'acides aminés sont alignées et comparées à chaque fois au WT (Wild Type) non édité grâce à l'outil bio-informatique « Bioedit ». Chaque acide aminé est codé par une lettre et couleur spécifique. Les acides aminés identiques à ceux du WT, sont désignés par des points avec la couleur correspondante. Le « - » indique une délétion des acides aminés des plantes transgéniques, alors que dans le WT le tiret indique une insertion d'acide aminé à ce niveau dans les plantes T0. La flèche et les astérisques rouges indiquent le site de coupure de la cas9. Les astérisques noirs représentent des codons STOP.

A : Trois plantes transgéniques ayant séquences protéiques différentes du même gène ciblé SIPHT1. Ces séquences sont éditées dans la région autour des sites de coupures de la cas9. Ici les protéines 1 et 2 de la plante 3 paraissent identiques. En cherchant dans toute la séquence protéique éditée de la plante 3, les protéines 1 et 2 sont finalement différents, puisqu'elles n'ont pas les mêmes acides aminés (les différences sont encadrées en orange). B : Plantes transgéniques pour le gène SIPHT2. La séquence protéique 1 de la plante 3 présente une importante délétion d'acides aminés entre les deux sites de coupure de la cas9. C : Plantes transgéniques pour le gène SIPHT4, des éditions génétiques avant les sites de coupure de la cas9 sont visibles pour les 2 plantes.

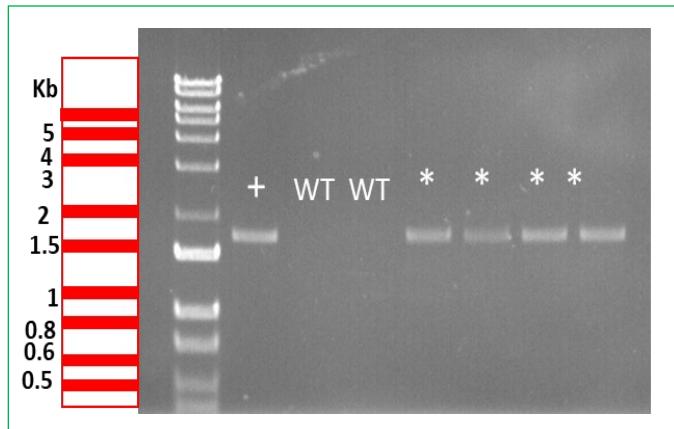
A partir de la génération T0, issue de la culture *in vitro*, il est difficile d'évaluer l'impact de la modulation génétique sur le niveau d'accumulation des phénolamides et l'expression des gènes ciblés, puisque les plantes sont majoritairement chimériques. Les plantes T0 ont subi aussi plusieurs changements de conditions de culture (*in vitro* puis dans le phytotron) et ce que cela peut engendrer comme impact sur la composition des métabolites dans ces plantes. Pour cela il faut passer à la génération suivante T1.

Tableau 16 : Types de plantes T0 régénérées par édition génétique

gène	Nombre de plantes	Type de plantes T0	Type de mutation protéique
SIPHT1	2	Non éditée	Pas de mutation
	4	Hétérozygotes	Substitution d'acides aminés
	7	Chimériques	Substitution d'acides aminés/ modification du cadre de lecture
SIPHT2	3	Bi-alléliques	Délétion des acides aminés/ modification du cadre de lecture
	4	Hétérozygotes	Substitution des acides aminés/ modification du cadre de lecture
	2	Chimériques	
SIPHT3	3	Hétérozygotes	Substitution des acides aminés/modification du cadre de lecture
	6	Chimériques	
SIPHT4	2	Hétérozygotes	Substitutions d'acides aminés/modification du cadre de lecture
	6	Chimériques	Substitution d'acides aminés/ modification du cadre de lecture
	1	Bi-alléliques	
	1	Non éditée	Pas de mutation
SIPHT3+ SIPHT4	5	Chimériques	Substitutions des acides aminés/ modifiaction du cadre de lecture

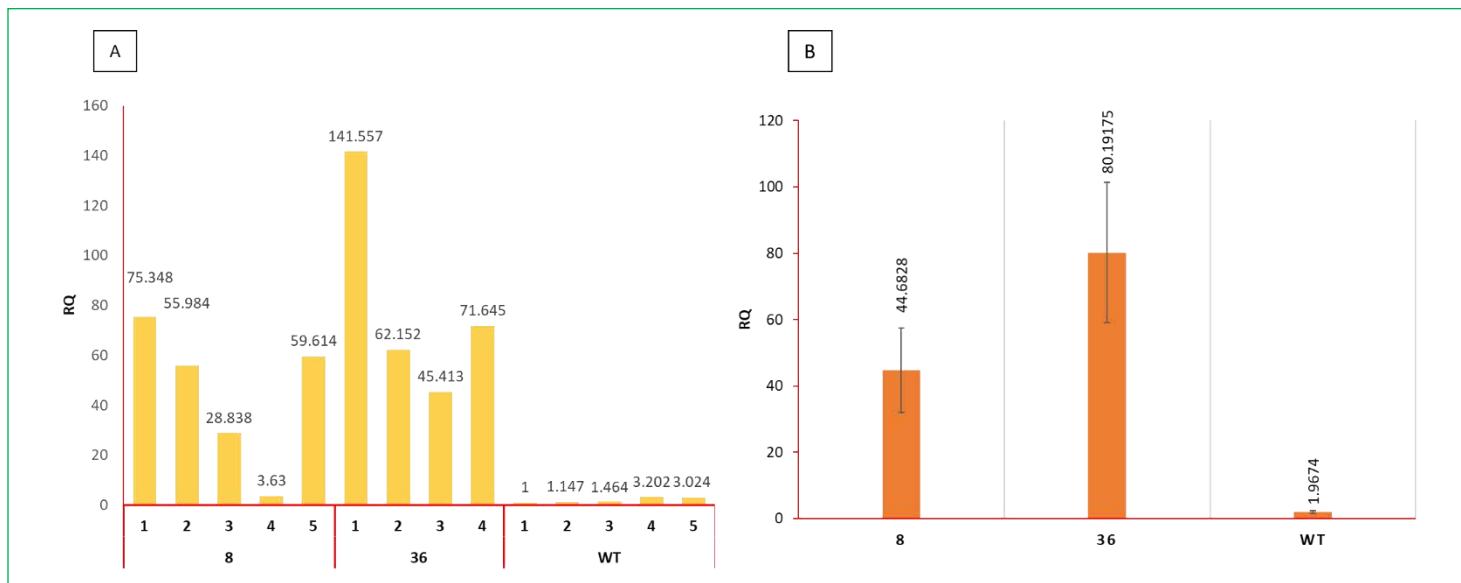
#### 4.5.Obtention de la génération T1

L'obtention de la génération T1, a demandé du temps, jusqu'à ce que les fruits murissent or à ce moment j'étais déjà dans les 4 derniers mois de thèse. Pour cette raison, je n'ai pas pu réaliser pleinement l'étude physiologique de ces plantes transformées T1. Par contre j'ai pu commencer le travail de caractérisation moléculaire des transformants T1 de plantes surexprimant solyc06g083900.2. J'ai ainsi extrait l'ADNg et l'ARN de 9 plantules T1 issues de deux événements de transformation différents (=2 plantes T0, numérotées 8 et 36). A partir de l'ADNg j'ai réalisé des amplifications par PCR pour détecter l'insertion de la construction de surexpression dans le génome de ces plantules en utilisant les amores du **Tableau 8**. Les résultats ont montré que les plantules T1 ont le promoteur 35S+l'ADNc de solyc06g083900.2 dans leur génome. Donc elles ont bien hérité les constructions qui leur permettent de surexprimer le gène (**Figure 58**).



**Figure 58 :** Amplification des constructions de surexpression à partir de l'ADNg des plantules T1. En astérisque 4 différentes plantules T1. WT : plante non transformée. + : plante T0 à partir de laquelle les plantules T1 proviennent.

Ensuite nous avons procédé comme décrit dans le **paragraphe 3.11 du chapitre 2** pour réaliser une qPCR à partir de l'ADNc de ces ARN. Nous avons utilisé les amorces décrites dans le **tableau 2 du chapitre 2** pour détecter le niveau d'expression du gène solyc06g083900.2 dans les plantules T1. Les résultats ont montré une surexpression importante de ce gène dans les plantules T1 par rapport aux plantules WT (non transformées) (**Figure 59**). A l'exception de la plantule T1 numéro 4 issue de la plante 8 T0 qui a montré un niveau d'expression du gène égale au celui des plantes WT) (**Figure 59**).



**Figure 59 :** Niveau d'expression du gène solyc06g083900.2 dans les différentes plantules T1 (1,2,3,4 et 5) issues des plantes 8 et 36 T0 en comparant avec le niveau d'expression du gène dans les plantes non transformées WT (1,2, 3, 4 et 5). A : les différentes valeurs du niveau d'expression du gène de chaque plante T1. B : Les moyennes des RQ des plantules T1 issues des plantes T0 (8, 36 et WT).  $P < 0.05$

Nous avons aussi regardé le niveau d'expression des gènes *SIPHT1* et *SIPHT2* dans les plantules T1 qui surexpriment à différents niveaux le gène *solyc06g083900.2* afin de voir si la surexpression de ce dernier conduit à leur surexpression. Les résultats n'ont cependant montré aucune différence entre le niveau d'expression de *SIPHT1* et *SIPHT2* dans ces plantes par rapport aux plantes non transformées (WT).

A l'heure de la rédaction de ce chapitre, l'analyse de leur composition en composés phénoliques et plus particulièrement en phénolamides doit encore être réalisée.

## 5. Discussion

L'objectif de ce chapitre était de créer des lignées T0 et T1 de tomate dans lesquelles l'expression des gènes *SIPHT1*, *SIPHT2*, *SIPHT3*, *SIPHT4* et *solyc06g083900.2* étaient modulées (gènes surexprimés ou éteints). Les lignées T0 constituent la clé pour l'obtention des générations suivantes, génétiquement modifiées, sur lesquelles les rôles physiologiques des phénolamides seront étudiés. Dans les travaux de ce chapitre, j'ai utilisé les constructions de surexpression réalisées dans le chapitre 2. De plus, j'ai réalisé les constructions CRISPR/Cas9 qui m'ont permis d'éteindre les gènes ciblés, en utilisant le système de rassemblement Golden Gate.

### 5.1. La génération des transformants a nécessité un travail de mise au point technique important

La régénération des plantes à partir des cotylédons de tomate, *in vitro*, s'est étalée sur plusieurs mois (8 à 9 mois), vu le nombre de constructions de surexpression (5) et de CRISPR/Cas9 (7) pour les deux variétés *Ailsa craig* et *WVa106*. Le protocole de régénération n'était pas établi au laboratoire, ce qui m'a amené à adapter le protocole utilisé au laboratoire BFP, selon le matériel et les produits présents au LAE. Pr. Hernould m'a recommandé d'utiliser un seul protocole de régénération pour les deux variétés de tomate et qui fonctionne pour les deux variétés dans son laboratoire. La régénération de la variété *Ailsa Craig* avec les phytohormones AIA et BAP cités dans ce protocole a causé des difficultés. C'est pourquoi, j'ai dû modifier ce protocole, notamment avec d'autres hormones plus adaptées à cette variété. Ainsi, j'ai utilisé le protocole de régénération de la variété *Micro-Tom*, fourni par le laboratoire BFP. Dans ce dernier protocole, les phytohormones utilisées sont le 2.4D, la kinétine et la zéatine. Pour les deux protocoles j'ai ajusté la concentration de thiamine-HCl et kanamycine dans les différents milieux.

Pour chaque construction, j'ai obtenu des cals. Cependant, *Ailsa craig* a montré un retard dans la régénération et la formation des cals, qui brunissaient et mourraient, ce qui n'est pas le cas

du cultivar WVa106. J'ai résolu le problème de brunissement en augmentant la concentration en thiamine-HCl dans le milieu de 0.9 mg/L à 1 mg/L et en diminuant la concentration de kanamycine de 150mg/L jusqu'à 100 mg/L. Néanmoins les cals des 6 constructions de cette variété (2 en surexpression et 4 en CRISPR/Cas9) n'ont pas survécu. En revanche, la régénération des WVa106, étant moins sensible, une seule construction a été perdue (*S/PHT1+ S/PHT2* en CRISPR/Cas9). Au final, j'ai obtenu 48 plantes transgéniques portant les constructions de surexpression, parmi lesquelles 39 sont de la variété WVa106, et 46 plantes portant les constructions de CRISPR, dont 39 sont de WVa106. Toutes les constructions de la variété WVa106 sont disponibles. Cette variété est donc très propice pour les travaux de régénération de tomate *in vitro*.

Lors de la formation des méristèmes apicaux, j'ai remarqué des phénotypes anormaux tels que l'absence de méristème apical, des feuilles blanches, des plantules entièrement blanches. Ces phénotypes anormaux sont indépendants des constructions et sont plutôt reliés à des facteurs environnementaux (hormones et vitamines dans le milieu, humidité..) et génétiques (teneur endogène en hormones des explants) de la culture *in vitro* (Plana et al., 2006) (Cho et al., 1998; Zhang et al., 2000; Song et al., 2012; Yan et al., 2019). Les « malformations », l'absence de méristème apical, le phénomène de feuilles individuelles issues d'un cal, ainsi que le phénomène de polyploïdie, sont causées par l'utilisation des phytohormones exogènes pour la régénération (Barg et al., 1997; Plana et al., 2006). Les formes de cytokines et d'auxine utilisées à la régénération ainsi que leur combinaison semblent capables de jouer un rôle très important dans la formation de plantes albinos (ou blanches) (Jiang et al., 1998). Ainsi, la combinaison BAP + 2.4-D dans le milieu de régénération de l'avoine, générerait moins de plante albinos (Hagio et al., 1995). La formation des plantes albinos est plutôt reliée à la longue durée du stade de cal pendant la régénération et la concentration de saccharose dans le milieu (Fellers et al., 1995; Altpeter et al., 1996; Song et al., 2012).

## **5.2. L'analyse des transformants a été perturbée par la mise en place de nouvelles enceintes phytotroniques**

Une fois rempotées dans le terreau, et sorties vers le phytotron, les plantes des deux variétés, ont présenté des phénotypes de stress, tels qu'une surface foliaire réduite, un jaunissement des feuilles, une coloration violette des feuilles et des tiges, ainsi qu'un fort avortement des fleurs qui s'est révélé être indépendant des constructions ou de la variété. Nous avons vérifié les conditions environnementales pouvant potentiellement impacter le développement et la croissance dans le phytotron comme l'intensité lumineuse, le pH du substrat, et la qualité du substrat. Il semble que

la lumière soit en cause dans ces symptômes. Le phytotron que j'ai utilisé pour élever ces plantes a été inauguré en 2020 suite au renouvellement des enceintes climatiques de l'ENSAIA. Il est équipé de panneaux de LED sensé restituer la qualité de la lumière solaire. Cependant, plusieurs expérimentateurs ont relevé sur les cultures (maïs, figuier notamment) des symptômes comparables à ce que j'ai observé sur les tomates. L'analyse du spectre de lumière visible a indiqué un déséquilibre très fort du ratio rouge claire/rouge sombre. Ce ratio a été en partie corrigé par l'ajout de lumière rouge sombre, mais les symptômes persistent, bien que moins sévères. De nouvelles corrections de la qualité de lumière sont en cours de réflexion, mais en l'état actuel, les conditions de croissance des plantes ne me permettent pas d'envisager une étude de la physiologie de mes plantes transformées.

### **5.3. La technique de transformation développée présente une grande efficacité**

Les résultats de génotypage des plantes T0 ont montré une très grande efficacité de transformation des plantes en surexpression en CRISPR/Cas9. L'efficacité en CRISPR Cas9, est équivalent au pourcentage des plantes T0 qui ont intégré la Cas9 dans leur génome et qui ont montré des éditions génétiques dans les séquences de leurs gènes ciblés. La majorité des plantes CRISPR/Cas9 obtenues étaient chimériques (57%), avec au moins 4 allèles différents du gène ciblé. Alors que 28 % étaient hétérozygotes avec un allèle non modifié, 9% étaient bi-alléliques avec deux allèles chacun édité d'une manière différente et 6.5% n'étaient pas éditées. Ces résultats sont proches de ceux obtenus dans la littérature (Brooks et al., 2014; D'Ambrosio et al., 2018b; Li et al., 2018b). Une étude a montré que, chez la tomate, le système d'édition CRISPR/Cas9 peut engendrer en moyenne 3,6 allèles différents pour un gène donné (D'Ambrosio, Stigliani, et Giorio 2018). Cela peut s'expliquer par le fait que la plante générée est mosaïque ou chimérique, c'est-à-dire qu'elle contient des cellules avec du matériel génétique édité de manière indépendante et potentiellement différente (Brooks et al., 2014; Ma et al., 2015a, 2015b; Liu et al., 2015). Les résultats du séquençage ont montré, que l'édition génétique ne se limitait pas aux sites ciblés, mais plutôt qu'elle s'étalait sur plusieurs nucléotides entre les deux sites de coupures.

Les mutations génétiques étaient majoritairement des insertions, mais aussi des substitutions de nucléotides, ou bien des délétions de quelques nucléotides. Le plus grand nombre de nucléotides supprimés et non remplacées étaient pour le gène *SIPHT2* où les sgRNA ciblées des séquences très proches (9 nucléotides les séparent). Ces mutations ont, dans la plupart des cas, engendré des mutations dans la séquence protéique (protéine tronquée due à des codons stops, modification du cadre de lecture). Dans d'autres cas les mutations ont donné des substitutions des

acides aminés (mutation faux-sens). Cette dernière ne signifie pas que la protéine est inactivée, ou a changé d'activité. Cela dépend si la mutation a eu lieu dans un site actif ou dans un site de fixation des substrats dans la protéine.

Les plantes T0 générées ont permis d'obtenir des plantules transgéniques T1 en surexpression et en CRISPR. Sur les plantes qui surexpriment les gènes ciblés, je vais chercher les constructions insérées dans leurs génomes pour valider la transmission de l'insertion de la génération T0. J'ai commencé ce travail sur des plantules issues de deux T0 différentes qui surexpriment le gène solyc06g083900.2, puisque c'était la construction où j'avais le plus de graines disponibles. Les résultats de PCR ont bien montré l'insertion du promoteur 35S+ l'ADNc du gène dans le génome. En parallèle les études du niveau d'expression du gène dans les plantes T1 par qPCR a montré des niveaux d'expression très supérieurs aux plantes sauvages. Ces niveaux d'expression sont assez variables ce qui peut s'expliquer par le site d'insertion du transgène dans le génome.

Le travail de caractérisation génétique doit se poursuivre sur les plantes surexprimant les PHT pour valider la transmission héréditaire des constructions de surexpression, ainsi que sur l'ensemble des plantes T1 CRISPR pour détecter les types d'édition héritées. Les taux de réussite élevés que j'ai pu obtenir sur les T0 et les premiers T1 analysés augurent bien de l'obtention de T1 pour l'ensemble des constructions que j'ai initiées. L'analyse de ces plantes (paramètres de croissance, contenu métabolique, résistance/sensibilité à des bioagresseurs) devra permettre de déterminer plus précisément le rôle physiologique des phénolamides.

#### **5.4. Solyc06g083900.2 est-il réellement impliqué dans la régulation de la voie des phénolamides ?**

Les analyses des plantes T1 surexprimant solyc06g083900.2 ont été initiées très récemment. Outre la confirmation que ces plantes surexpriment fortement le transgène, un premier résultat est que ces plantes ne présentent pas d'augmentation de l'expression des gènes *S/PHT1* et *S/PHT2* comme nous pouvions le supposer. Ce résultat va à l'encontre de l'hypothèse d'une régulation de l'accumulation de CP par solyc06g083900.2, *via* une induction des *S/PHT* à l'image de ce qui a été décrit chez *N. attenuata*. L'analyse de la composition métabolique de ces plantes devra permettre de conclure sur l'impact de solyc06g083900.2 sur la voie des phénolamides. Une étude très récente publiée en février 2021, a montré que la surexpression, chez la tomate, de solyc06g083900.2 (identifié sous le nom de *S/MYB14* dans la publication) se traduit par une accumulation plus forte de flavonoïdes (dérivés quercétine et kaempférol) , ainsi que d'une

surexpression des gènes associés à la biosynthèse des flavonoïdes dans des plantules de tomate (Li et al., 2021). Ces plantes transgéniques ont, par ailleurs, montré une tolérance au 2,4,6-trichlorophénol, un polluant organique causant des stress oxydants chez les plantes) (Li et al., 2021). Ainsi les auteurs ont suggéré un rôle de ce gène dans la biosynthèse des flavonoïdes et un rôle de maintien de l'homéostasie des radicaux libre chez la tomate (Li et al., 2021). Les auteurs ont également montré que l'expression de *solyc06g083900.2* est initié après une cascade d'évènements qui passe par la voie de signalisation de l'acide jasmonique qui active le facteur *S/MYC2* (Li et al., 2021). *S/MYC2* dans la publication est le même *solyc08g076930* que celui que j'ai identifié dans mon travail. Cette publication confirme ainsi l'hypothèse que j'avais émise au début de ce travail pour le choix des gènes candidats. L'implication de *solyc06g083900.2* dans la biosynthèse de flavonoïdes ne veut cependant pas dire que ce gène n'est pas aussi impliqué dans d'autres voies des biosynthèses, notamment celle des phénolamides. L'analyse métabolique conduite par Li et al., 2021 était ciblée sur les flavonoïdes et les anthocyanes car les plantules transgéniques apparaissaient plus violettes que les plantes témoins. L'analyse métabolomique que je souhaite conduire sur mes plantes pourraient permettre d'identifier d'autres voies modulées par ce facteur de transcription. Une observation que j'ai pu réaliser est que les plantes T0 CrispR de *solyc08g076930*, que j'ai générées, présentaient un retard important de développement et ont fini par mourir. Il s'agit de la seule lignée CrispR que j'ai perdu sur le cultivar Wva106. Cela amène à se poser la question du caractère essentiel de ce facteur de transcription pour la plante. Plusieurs facteur de transcription de la famille R2R3 MYB jouent un rôle essentiel dans la régulation du développement, dans le métabolisme et dans les réponses de la plante aux stress(Dubos et al., 2010; Zhao et al., 2014; Gates et al., 2016; Naing and Kim, 2018; Ma and Constabel, 2019). Le caractère essentiel de *solyc08g076930* pourrait être expliqué par le rôle proposé par Li et al., 2021 dans la régulation de stress oxydatif.

## **Chapitre 4 : Evaluation de propriétés biologiques de phénolamides de tomate induits par l'herbivorie de *T. absoluta***

## 1. Préambule

En parallèle à mes travaux destinés à identifier des gènes clés de la biosynthèse de phénolamides chez la tomate et à créer des outils permettant l'étude de leur fonction *in planta*, j'ai étudié leur intérêt dans le secteur de la santé. Les phénolamides sont des molécules pour lesquelles un grand nombre d'activités thérapeutiques ont été démontrées. Dans ce cadre, nous avons rédigé un article de review sur ce sujet, publié en 2020 dans le journal *Biomedicine and Pharmacotherapy*, pour lequel je suis 1<sup>er</sup> auteur.

Je débuterai ce chapitre en présentant succinctement les principales activités thérapeutiques associées aux phénolamides, puis je décrirai les travaux que j'ai conduits en collaboration visant à évaluer les propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires de phénolamides de tomate induits par l'herbivorie de *T. absoluta*.

## 2. Introduction

La bioactivité des phénolamides a été initialement étudiée dans les années 1970, et actuellement elle est étudiée principalement dans un contexte éthnopharmacologique<sup>5</sup>. En effet, les herbes médicinales et les baies asiatiques, comme les baies de goji (wolfberries, fruits de *Lycium barbarum L.*), jikoppi (écorce de racine de *Lycium chinense* Miller), l'herbe du shoo-fly (pomme-du-Pérou, *Nicandra physaloides Schreb.*), le carthame (*Carthamus tinctorius L.*), la croix maltaise (fruits de *Tribulus terrestris L.*), le veloutier (*Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger) et *Scopolia tangutica* Maxim., qui présentent une pléthore de propriétés bénéfiques pour la santé, sont riches en divers phénolamides qui ont été ciblés et se sont souvent révélés être des molécules actives de ces extraits (Funayama et al., 1980; Long et al., 2014). Une récente revue sur la phytochimie du genre *Lycium* a rapporté 42 phénolamides différents, représentant environ 12% des métabolites connus dans ce genre (Qian et al., 2017). De plus, la présence de phénolamides dans les légumes comestibles tels que l'aubergine (*Solanum melongena L.*), la tomate (*Solanum lycopersicum L.*), le cacao (*Theobroma cacao L.*), l'avoine (*Avena sativa L.*), a permis d'envisager d'utiliser ces molécules comme ingrédients alimentaires bénéfiques pour la santé. L'éventail des propriétés biologiques des phénolamides liées à la santé est large. Ils comprennent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antimicrobiennes et anticancéreuses ainsi que des activités protectrices du syndrome métabolique, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives.

---

<sup>5</sup> L'étude des plantes médicinales en lien avec leur utilisation empirique et la médecine traditionnelle locale.

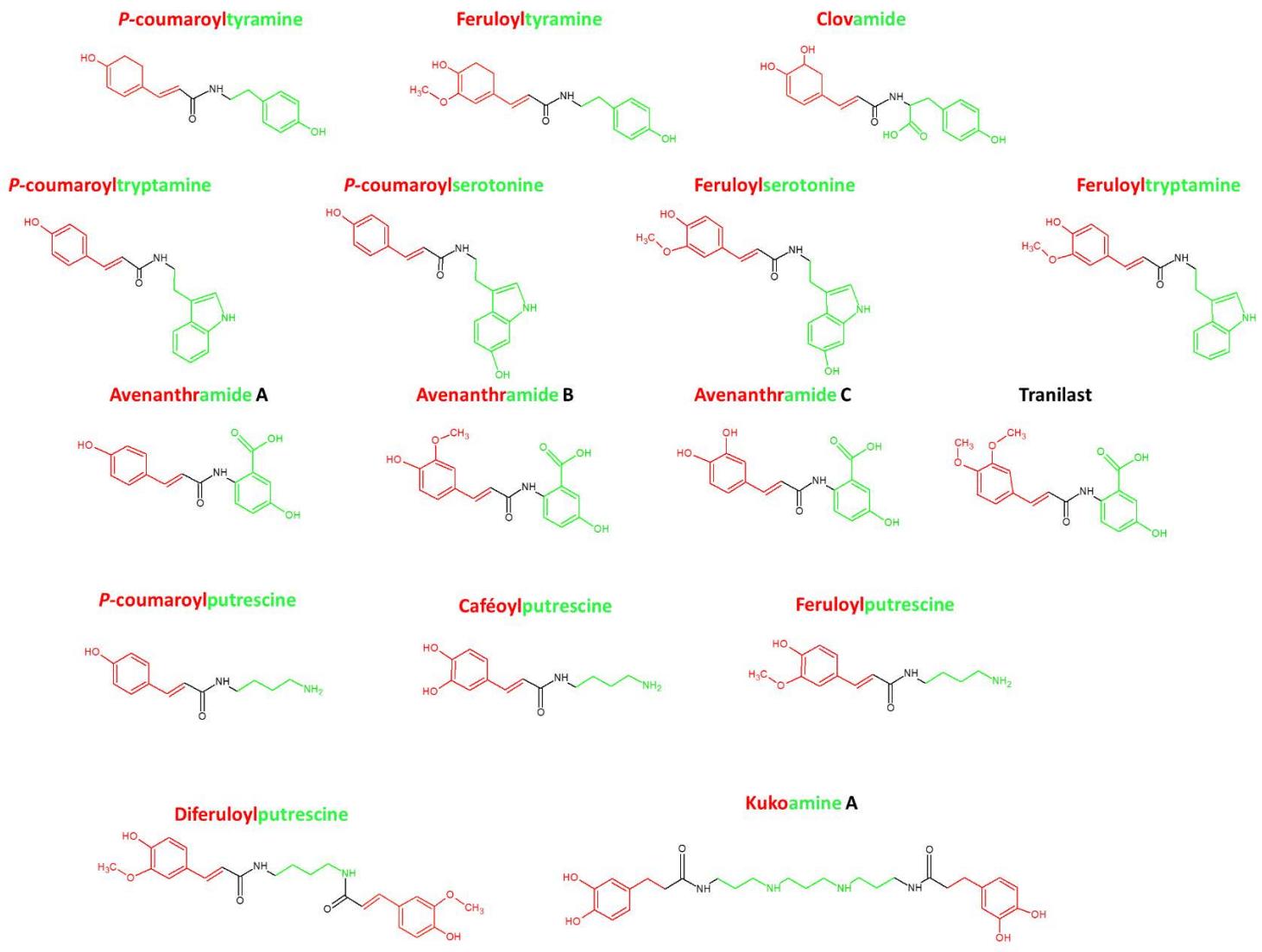
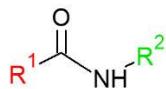


Figure 60: Structure des phénolamides. En rouge les dérivés d'acide hydroxycinnamique et les monoamines aromatiques ou polyamines aliphatiques et en noir la liaison amide. Tranilast est un phénolamide de synthèse

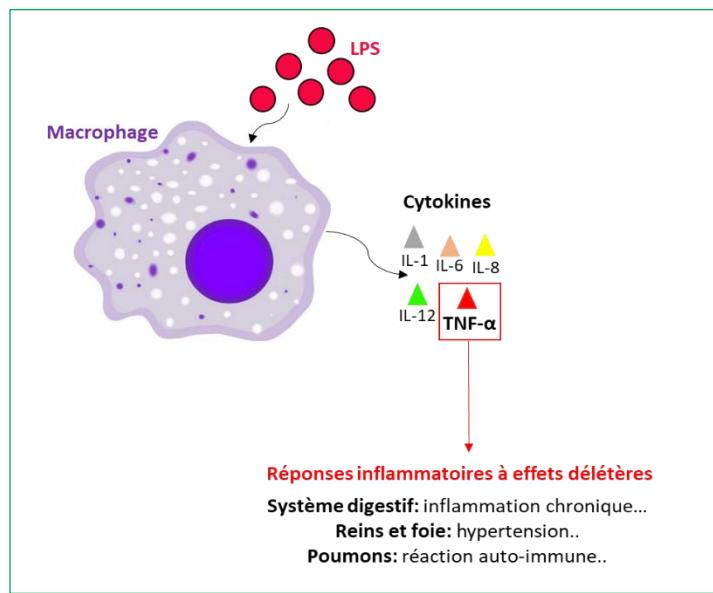
## 2.1. Activités anti-inflammatoires des phénolamides

### 2.1.1. Processus d'inflammation

L'inflammation est un processus complexe impliqué dans la réponse immunitaire d'un organisme à divers stimuli tels qu'une infection et / ou une lésion tissulaire (Medzhitov, 2008). Ce processus est contrôlé temporellement et spatialement par les régulateurs plasmatiques et cellulaires et il est considéré comme un levier pour maintenir l'état homéostatique basal. Le mode de vie moderne, à travers un régime riche en graisses et / ou en glucose, a un impact constant sur

l'homéostasie basale et peut induire un état inflammatoire chronique (Kotas and Medzhitov, 2015; Medzhitov, 2008). L'inflammation chronique est un facteur de risque et un contributeur à un large éventail de maladies, y compris le diabète de type 2 (Donath and Shoelson, 2011), les maladies cardiovasculaires (Taube et al., 2012), les cancers (Lu et al., 2006; Trinchieri, 2012) et les maladies neurodégénératives (Hirsch and Hunot, 2009). Identifier et caractériser des molécules anti-inflammatoires efficaces, éventuellement d'origine naturelle, est donc une préoccupation majeure.

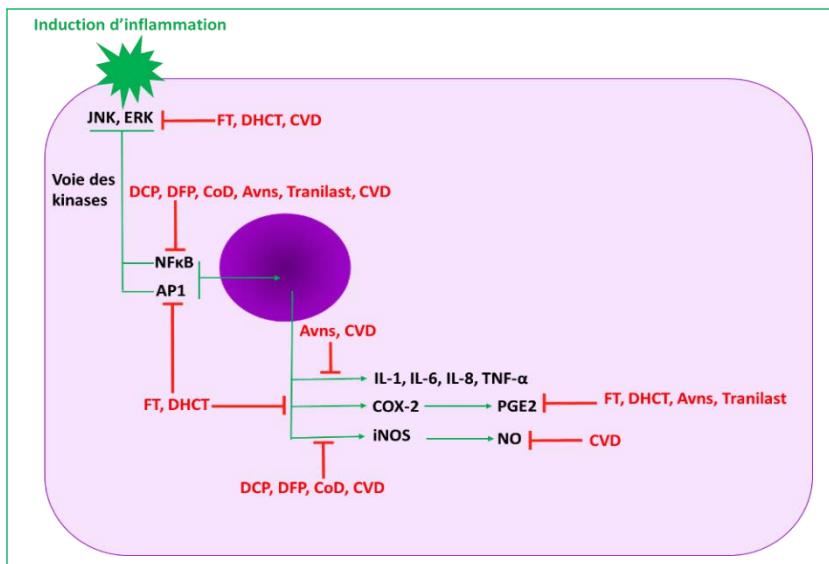
Plusieurs études ont évalué les propriétés anti-inflammatoires des phénolamides, en tant que principe actif d'origine naturelle (alimentation, phytothérapie) ou en tant que composés synthétisés chimiquement. Un modèle classique pour étudier les propriétés anti-inflammatoires potentielles des molécules est de stimuler les monocytes et / ou les macrophages avec des molécules pro-inflammatoires telles que le lipopolysaccharide (LPS) et de vérifier si la ou les molécules ajoutées sont capables de contrer cet effet. Une fois les cellules stimulées par du LPS, celles-ci vont répondre en synthétisant et sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6...) (Figure 61). Ces cytokines affectent le système rénal, stimule l'hypertension, ainsi que d'autres effets indésirables (Mehaffey and Majid, 2017). D'autres cellules peuvent être utilisées pour l'étude des effets anti-inflammatoires comme la lignée cellulaire embryonnaire de rein humain (HEK-293) et la lignée cellulaire de muscle squelettique (C2C12) (Xie et al., 2014; Yeo et al., 2019).



**Figure 61:** Réponse des macrophages à un stimulus comme le LPS (polysaccharide). Les macrophages stimulés par du LPS synthétisent et excretent des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines, notamment la TNF- $\alpha$  est transportée par le sang vers différents organes. Ce qui conduit à différentes réponses inflammatoires dans les organes ciblés.

## 2.1.2. Rôles anti-inflammatoires

Le rôle anti-inflammatoire des phénolamides a été étudié pour plusieurs molécules et sur différents types de lignées cellulaires. Des exemples des molécules étudiées sont représentées dans la **Figure 62**. La dicoumaroylputrescine, la diféruleoylputrescine et la *p*-coumaroyldopamine inhibent la translocation nucléaire du facteur de transcription NF $\kappa$ B (Kim et al., 2012; Lee et al., 2015). En effet, NF $\kappa$ B stimule la transcription des gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires tels que IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$ . Ainsi, l'inhibition de translocation de NF $\kappa$ B empêche l'activation de ces gènes (Kim et al., 2012; Lee et al., 2015) (**Figure 62**). La dihydrocaféoyltyramine et la féruloylputrescine contrôlent l'expression du cyclooxygénase 2 (COX-2) et ainsi inhibent la synthèse du prostaglandine E2 (PGE2) qui joue un rôle important dans l'inflammation. Ces deux phénolamides inhibent aussi la translocation nucléaire des facteurs de transcription AP1 (protéine activatrice 1) et C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein) en bloquant l'activité des kinases telles que JNK (c-Jun N-terminal kinase) et ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Han et al., 2010; Wang et al., 2020) (**Figure 62**). D'autres phénolamides comme les avenanthramides réduisent la translocation de NF $\kappa$ B, en inhibant IKK $\beta$  (I $\kappa$ B kinase b), ce qui inhibe l'expression des cytokines IL-1, IL-6 et l'accumulation des ROS (espèces réactives de l'oxygène).



**Figure 62 :** L'inflammation induit l'activation de la voie des kinases, notamment JNK (c-Jun N terminal kinase) et ERK (kinase régulatrice du signal extracellulaire). Cela conduit à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF $\kappa$ B et l'activation du facteur de transcription AP1 (protéine activatrice 1). En conséquence, la transcription de la synthase iNOS, de la cyclooxygénase COX2, et des cytokines proinflammatoires IL-1, -6, -8 et TNF $\alpha$  sont induits. Les étapes d'inflammation inhibées par les différents phénolamides sont représentées en rouge. CoD : *p*-coumaroyldopamine; FT: féruloyltyramine; DHCT: dihydrocaféoyltyramine; DCP: dicoumaroylputrescine; DFP: diféruleoylputrescine; CVD: clovamide; Avns: avenanthramides.

## 2.2. Activité antimicrobienne des phénolamides

La littérature sur les activités antimicrobiennes des phénolamides est relativement rare, et la méthodologie utilisée pour définir la concentration minimale inhibitrice (CMI) est souvent différente entre les études et ne suit pas toujours les normes internationales, ce qui rend la comparaison difficile. D'une manière générale, les phénolamides sont principalement décrits comme des agents antimicrobiens à efficacité moyenne à faible. En ce qui concerne les activités antibactériennes, les composés les plus actifs présentant une valeur CMI inférieure à 99 µg / mL ont été trouvés contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* (Yingyongnarongkul et al., 2006, 2008; Georgiev et al., 2012). Les groupements dihydrocaféoyl semblent être très importants, car ils confèrent une activité antibactérienne contre plusieurs souches de *S. aureus*, y compris les souches résistantes à la méthicilline (SARM) et à la vancomycine (VRSA) (CMI <50 µg / mL) (Yingyongnarongkul et al., 2006, 2008). La dihydrocaféoyltyramine, la *trans*-féruloyloctopamine et la *trans*-féruloyltyramine, extraites de l'écorce de racine de *Lycium chinense* Mill., présentent des activités antifongiques significatives (5 µg / mL <CMI <10 µg / mL) contre *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Lee et al., 2004). Les extraits riches en phénolamides tels que les extraits de feuilles de *Lycium barbarum* et de *Lycium chinense* ont également montré des activités antibactériennes significatives contre *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* (Mocan et al., 2014). L'activité antimicrobienne des phénolamides a également été étendue aux kinétoplastides. Ces derniers représentent une classe de protistes parasites, dont trois sont à l'origine de maladies tropicales humaines majeures : la trypanosomiase humaine africaine, la maladie de Chagas et la leishmaniose. La recherche de nouveaux antikinétoplastides est très active. Parmi les cibles potentielles, l'identification d'un inhibiteur de la trypanothione synthase est prometteuse (Jagu et al., 2017). La voie trypanothione régule le potentiel redox dans les kinétoplastides. Le trypanothione est synthétisé par la trypanothione synthase à partir de deux molécules de glutathion et une de spermidine. La conception d'inhibiteurs de la trypanothione synthase à base d'analogues de la spermidine semble très prometteuse (Jagu et al., 2017). Dans ce contexte, la kukoamine A et ses analogues ont été sélectionnés avec succès comme inhibiteurs de la trypanothione synthase (Ponasik et al., 1995).

## 2.3. Activité anti-cancéreuse des phénolamides

Les propriétés anticancéreuses des phénolamides ont été étudiées et rapportées uniquement pour plusieurs métabolites et types de cancer. Ces propriétés peuvent être distinguées en trois catégories basées sur le mécanisme d'action: (i) blocage du cycle cellulaire, (ii) induction de

l'apoptose et (iii) inhibition des métastases (Rocha et al., 2012) (**Tableau 17**). Le mécanisme anticancéreux de certains phénolamides a été bien étudié. Ainsi, les composés *p*-coumaroylsérotonine et avenanthramide C, tranolast et dihydroavenanthramide D (**Figure 60**) ont montré des effets anticancéreux importants dans le cas du cancer du sein (Lee et al., 2011; Subramaniam et al., 2011; Hastings and Kenealey, 2017; Mitsis et al., 2018). Les composés *p*-cétoyltyramine, *p*-coumaroyltyramine, et diféruleylputrescine jouent un rôle intéressant contre ce cancer (Park and Schoene, 2003; Park, 2012; Kim et al., 2014). En plus du *p*-coumaroylsérotonine du carthame et des graines des centaurée, le féruloylsérotonine et la kukoamine A ont montré des effets antiprolifératrices importantes dans le cas du glioblastome (un cancer du cerveau particulièrement invasif) (Platten et al., 2001; Wang et al., 2016; Lazari et al., 2017; Alexiou et al., 2017). Le rôle inhibiteur des avenanthramides d'avoine a été décrit dans le cas des différents cancers digestifs notamment l'avenanthramide A qui active la sénescence cellulaire du cancer colorectal (Guo et al., 2010; Scarpa et al., 2018; Fu et al., 2019a, 2019b). D'autres phénolamides dérivés d'acide anthranilique en plus du N-*trans*-féruloyloctopamine extrait de la paroi de l'ail, ont montré des activités anti-cancéreuses des cancers digestifs (carcinome, cancer du côlon) comme le N-(E)-*p*-coumaroyl-3-hydroxy acide anthranilique et le N-(E)-cafeoyl-3-hydroxy acide anthranilique (Bai et al., 2017; Finetti et al., 2018).

En conclusion, depuis leur première découverte en tant que composés bioactifs dans les années 1970, les phénolamides présentent un intérêt pharmacologique important. A l'heure actuelle, environ 100 différentes structures de phénolamides ont montré une diversité d'activité thérapeutique. Cependant, la diversité structurelle des phénolamides est beaucoup plus large que les structures rapportées. La génération de structures théoriques basées sur les groupements phénoliques et aminés les plus courants peut, en effet, atteindre plusieurs centaines. Ainsi, le potentiel de découverte de nouvelles bioactivités parmi cette famille de métabolites est énorme.

Tableau 17 : Activité anti-cancer des phénolamides

Phénolamides	Types de cancer	Activités anticancéreuses
<i>p</i> -coumaroylsérotonine	Cancer du sein	Cytotoxicité pour les cellules cancéreuses
Avénanthramides		Apoptose des cellules cancéreuses
Tranilast		Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses
dérivés de la tyramine (caféoyl- et coumaroyl-) et la putrescine	Cancer du sang (leucémie)	Arrêt de la croissance cellulaire et induction de l'apoptose
Diférouloylputrescine		Inhibition de la prolifération cellulaire
<i>p</i> -coumaroylsérotonine, feruloylsérotonine	Cancers du cerveau	Blocage du cycle cellulaire et induction de l'apoptose
kukoamine A		Blocage du cycle cellulaire, induction de l'apoptose et inhibition de invasion cancéreuse.
Tranilast		Réduction de la prolifération cellulaire
Avenanthramides	Cancers du système digestif	Inhibition de la prolifération cellulaire, activation de la senescence cellulaire et inhibition de l'invasion
N-trans-feruloyloctopamine		Inhibition de la prolifération cellulaire et de l'invasion

#### 2.4. Activités thérapeutiques connus de quelques phénolamides présents chez la tomate

Plusieurs phénolamides sont identifiés chez la tomate en réponse à des stress. Parmi ces phénolamides, certains sont étudiés pour leurs rôles thérapeutiques en tant que antioxydants tels que la kukoamine A/B, la féruloylputrescine, la *p*-coumaroyltyramine et la féruloyltyramine. La féruloylputrescine et la *p*-coumaroyltyramine ont montré une activité régulatrice de la glycémie, en inhibant l' $\alpha$ -glucosidase (Song et al., 2016). La kukoamine B diminue aussi la glycémie (Li et al., 2019). La *p*-coumaroyltyramine a montré également une activité anti-cancéreuse contre la leucémie (Kim et al., 2014). Un autre dérivé tyramine, la féruloyltyramine, présente des activités anti-inflammatoires et antibactériennes contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *L. monocytogenes* (Georgiev et al., 2012). Ce phénolamide inhibe aussi l'agrégation des plaquettes sanguines (Park, 2009, 2015, 2016). La kukoamine A est considérée comme un produit bioactif neuroprotecteur, dont le mécanisme d'action est de diminuer la production des ROS et bloquer les récepteurs NMDARS, considérés comme éléments clé pour l'induction de l'altération et de la destruction neuronales (Hu et al., 2015). De plus, il permet l'inhibition de la prolifération des cellules du cancer de cerveau, le glioblastome (Wang et al., 2016). Ce phénolamide a montré aussi des propriétés hypotensives (Funayama et al., 1980) et anti-inflammatoires (Hadjipavlou-Litina et al., 2009).

## 2.5. Evaluation des propriétés thérapeutiques des phénolamides de tomate induits par l'herbivorie de *T. absoluta*

L'herbivorie de *T. absoluta* augmente la concentration d'une dizaine des phénolamides, comme la CP et la féruloylputrescine, déjà identifié chez la tomate. Elle induit l'accumulation de molécules jamais détectées chez la tomate, à de fortes concentrations comme le N1, N5, N14- tris (dihydrocaféoyl) spermine (TDHC spermine), et N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine (DHC spermidine), ou à des faibles concentrations comme la kukoamine A/B (kukA/B) (**Tableau 18**).

Un certain nombre de phénolamides accumulés ont des propriétés thérapeutiques avérées (féruloylputrescine, dihydrocaféoylputrescine et kukoamine A/B) (**voir paragraphe 2.4**) (**Tableau 18**). La kukoamine A constitue le phénolamide le plus étudié pour ses effets anticancéreux et ses activités anti-inflammatoires (**paragraphe 2.4**). Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, en dépit d'un large panel d'activités thérapeutiques potentielles, un travail important de caractérisation des propriétés d'un grand nombre de phénolamides reste encore à réaliser, en particulier vis-à-vis d'activité antimicrobienne ou anti-inflammatoire.

*Tableau 18 : Les phénolamides majoritaires de tomate induits par l'herbivorie de *T. absoluta**

Phénolamides	Structures	Quantité plante témoin/plante infestée (µg/g de matière sèche)
<b>N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine</b>		<b>10/1200</b>
<b>Caféoylputrescine</b>		<b>3/50</b>
<b>N1,N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine</b>		<b>0/30</b>
<b>Kukoamine A/B</b>		<b>0/20</b>
<b>Féruloyl putrescine</b>		<b>0/10</b>
<b>Féruloyl-Lysine</b>		<b>0/10</b>
<b>Dihydrocaféoyl putrescine</b>		<b>0/10</b>

Les travaux de ce chapitre ont pour objectif de caractériser des propriétés biologiques des principaux phénolamides induits par l’infestation de *T. absoluta*. Notre démarche expérimentale consiste à faire pousser des plants de tomate en vue de produire des extraits métaboliques contenant des phénolamides, à purifier ces extraits, à caractériser les molécules d’intérêt qu’ils contiennent, et à déterminer leurs propriétés biologiques (**Figure 63**). Pour cela, il a fallu optimiser les conditions d’infestation et de culture des tomates afin d’obtenir les concentrations les plus fortes en phénolamides dans la biomasse. Nous nous sommes intéressés en premier temps aux phénolamides en quantité plus fortes que les autres dans les extraits. Le TDHC spermine est particulièrement intéressant. En plus de sa forte accumulation dans les tissus de tomate, cette molécule présente une structure très proche des kukA/B, avec un groupement dihydrocaféoyl supplémentaire qui pourrait diversifier ou potentialiser ses propriétés biologiques (**Figure 63**). Cette molécule présente la plus grande concentration par rapport aux autres phénolamides dans les plantes infestées par *T. absoluta* ; il est le plus fortement induit par l’herbivorie, ce qui permet d’envisager son extraction et sa purification. Les 3 autres phénolamides d’intérêt sont la CP et les deux isomères kukoamine A et kukoamine B. Ces molécules sont disponibles en synthèse chimique dans le commerce. Nous avons ensuite évalué les effets thérapeutiques des molécules pures en réalisant des tests anti-inflammatoires, antibactériens et anticancéreux (**Figure 63**).

Les travaux de ce chapitre s’inscrivent intégralement dans le projet AnTIdOTe « Activités Thérapeutiques de métabolites spécialisés impliqués dans l’Interaction tOmate-*Tuta absoluta* ». C’est un projet collaboratif entre 4 entités de l’Université de Lorraine, le Laboratoire Agronomie et Environnement (LAE) qui le porte, le Laboratoire d’Ingénierie des Biomolécules (LIBio), le Laboratoire Lorraine de Chimie Moléculaire (L2CM) et le Laboratoire de Stress Immunité Pathogènes (SIMPA). L’objectif d’AnTIdOTe financé par l’Idex Lorraine Université d’Excellence, action ‘Impact Biomolécules’. Ce projet finance les travaux de purification, d’achat des molécules disponibles en synthèses chimiques ainsi que les tests de criblage des activités thérapeutiques.

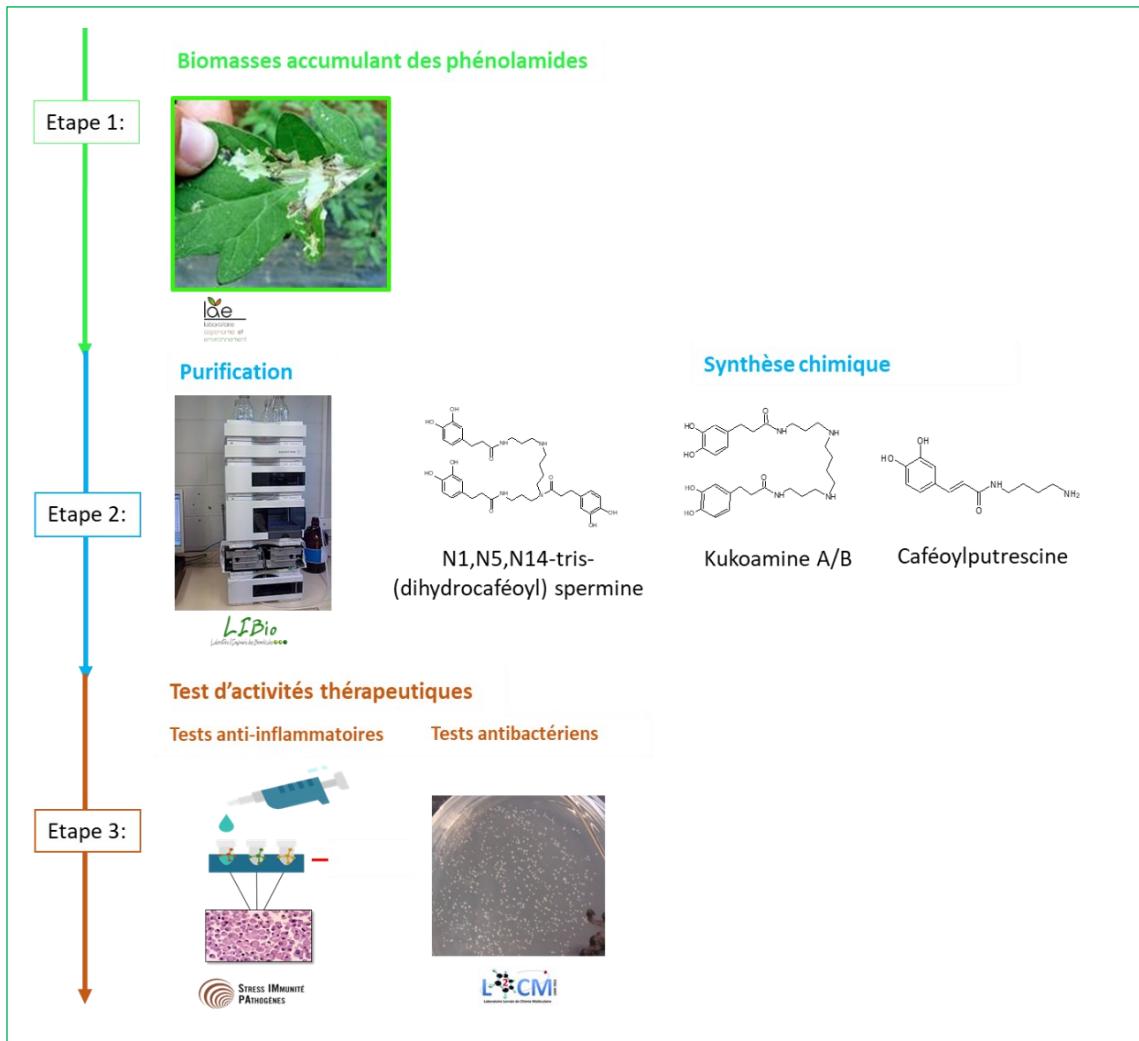


Figure 63: Les étapes de la démarche de recherche du chapitre 4.

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Matériels biologiques :

**Tomate** (*Solanum lycopersicum* L.). Les graines de tomate de la variété Better Bush (hybride VFN, fournisseur : Tomato Growers) sont mises en germination dans du terreau puis disposées en serre. Les jeunes plantes sont cultivées pendant 20 jours (après l'apparition des cotylédons), ce qui correspond à une plantule de 4 feuilles bien développées. Les plantes sont utilisées pour l'agro-infiltration.

***T. absoluta***. Les pupes fournies par l'Institut Sophia Agrobiotech sont mises dans un insectarium avec des plants de tomates pour se développer et boucler leur cycle de vie. L'insectarium est placé dans une serre et avec des plants de tomates disposés à l'intérieur pour

alimenter *T. absoluta* qui s'y multiplie. Les larves en deuxième et troisième stade larvaire sont utilisées dans les expériences.

**Cellules macrophages.** La lignée THP-1, provient des monocytes humains d'origine leucémique différenciables en macrophages sous PMA (phorbol-12-myristate-13-acétate) à 20 mM. Cette lignée est fournie par le laboratoire SIMPA.

**Bactéries pathogènes.** Les bactéries pathogènes sont fournies par le laboratoire L2CM, plateforme ABC. Elles sont utilisées pour les tests antibactériens. Bactéries gram (-) : *P. aeruginosa* (responsable des infections chroniques et aigus, urinaires, cutanées, pulmonaires, ophtalmologiques), *E. coli* (infections urinaires, entériques), *K. pneumoniae* (infections urinaires, pulmonaires et du tube digestif), *A. baumannii* (infections respiratoires), *E. cloacae* (infections urinaires, bactériémie, infections respiratoires). Bactéries gram (+) : *S. aureus* (infections cutanées, conjonctivite, pneumonie), *E. faecalis* (infections urinaires, endocardites et intra abdominales). L'inoculum bactérien a été réalisé afin d'avoir une concentration finale de  $5.10^5$  UFC (Unité Faisant Colonie) /mL.

### 3.2. Préparation des extraits qui accumulent les phénolamides

J'ai bénéficié de stocks de poudres de feuilles de tomates soumises à l'herbivorie de *T. absoluta* obtenus lors de la thèse de Victoire Coqueret (2013-2017). J'ai utilisé des poudres issues de 4 traitements : tomate sous faible nutrition azotée sans *T. absoluta* (LN-T) et tomate sous faible nutrition azotée avec *T. absoluta* (LN+T), Tomate sous forte nutrition azotée sans *T. absoluta* (HN-T), tomate sous forte nutrition azotée avec *T. absoluta* (HN+T) (**Tableau 19**). Ces échantillons vont permettre d'obtenir des extraits bruts en vue de purifier le TDHC spermine et pour les premiers tests d'activités antibactériennes et anti-inflammatoires.

**Tableau 19:** Différents extraits utilisés pour les premiers tests de criblage d'activités thérapeutiques.

Échantillons	Saine/ Infestée par <i>Tuta absoluta</i>	Concentration d'azote dans la solution nutritive	Type d'échantillon
LN-T	Saine		
LN+T	Quatrième feuille du haut infestée par Tuta	Teneur limitée en azote (30µM)	Troisième feuille du haut de la plante
HN-T	Saine		
HN+T	Quatrième feuille du haut infestée par Tuta	Excès en azote (1mM)	

A partir de 1g de poudre de chaque échantillon, j'ai ajouté 35 mL de méthanol 60%, puis ce mélange est incubé pour une nuit à température ambiante. Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré et le culot re-suspendu à part dans 10mL de méthanol 60% à température ambiante pendant une journée. Les surnageants récupérés après centrifugation (pendant 10 minutes à 13000 rpm) sont ajoutés aux autres surnageants récupérés. Ils sont ensuite passés au speed vacuum pendant 6h (vaporisation du méthanol). Ensuite la solution est versée dans des boites de Pétri en verre puis congelée à -80°C. Après congélation, les boîtes de Pétri avec la solution solidifiée sont passées au lyophilisateur. A partir de la poudre lyophilisée, 5 mg de chaque échantillon sont pesés pour les tests antibactériens et 1.5mg / échantillon pour les activités anti-inflammatoires. Pour déterminer la teneur en phénolamides en UPLC, 30 mg de chaque extrait sont dissous dans 500μl de méthanol 70% (Figure 64, Tableau 20 et Figure 81 en annexe). L'extrait HN+T (Excès en azote + herbivorie) contient le plus de phénolamides, notamment TDHC spermine, en second rang vient LN+T, HN-T et LN-T.

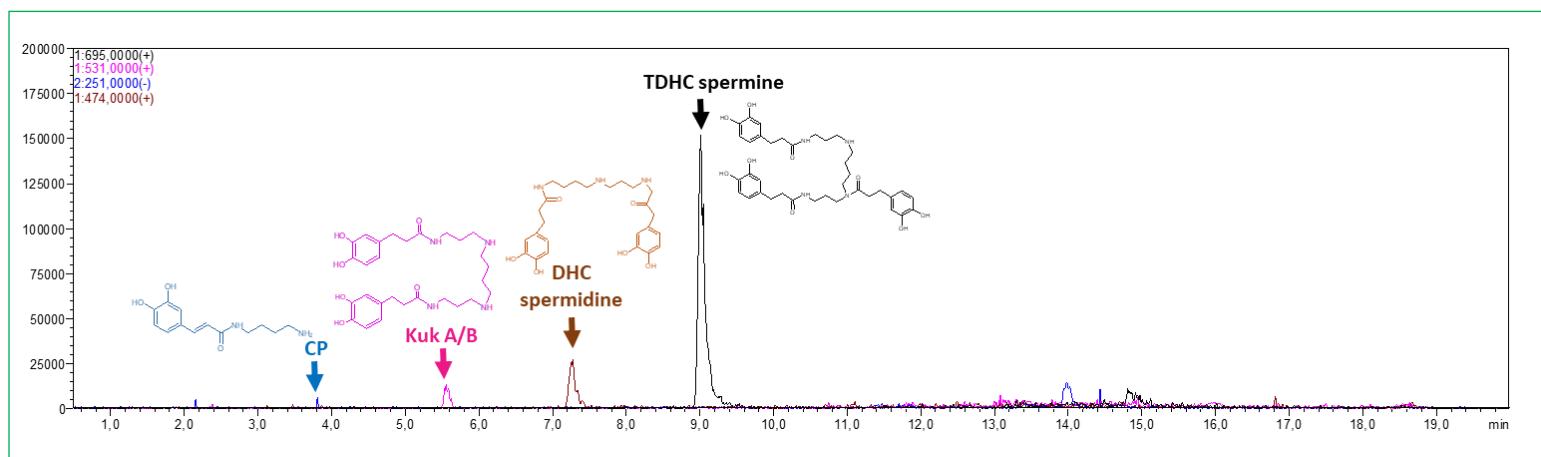


Figure 64 : Chromatogramme des analyses UPLC de la teneur en phénolamides de l'extrait LN-T. CP : Caféoylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. KukA/B : Kukoamine A et B.

Tableau 20 : Teneur en phénolamides pour chaque extrait. La teneur est exprimée en aires de pics détectés dans les chromatogrammes UPLC. CP : Caféoylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. KukA/B : Kukoamine A et B.

Extrait	CP	DHC spermidine	TDHC spermine	Kuk A/B
LN-T	69 185	+	167 784	+
LN+T	94 858	++	479 213	+++
HN-T	96 635	+++	238 457	++
HN+T	148 288	++++	724 502	++++
			3 993 990	++++
				962 596
				++++

### 3.3. Biosynthèse du N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine

#### 3.3.1. Infestation des tomates par *T. absoluta*

Des plantes de tomates âgées de 20 jours sont infestées par des larves *T. absoluta* au 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> stade larvaire. Chaque plante est infestée par une moyenne de 6 larves/feuille. Le montage est installé dans un insectarium, et l'ensemble positionné dans une petite serre où la température varie entre 15°C pendant l'hiver et 35°C pendant l'été. Après 4 jours d'infestation, les larves sont sorties de leurs mines et déposées sur des nouvelles plantes à l'aide d'un pinceau, et les parties aériennes des plantes sont récoltées, congelées immédiatement à l'azote liquide et conservées à -80°C.

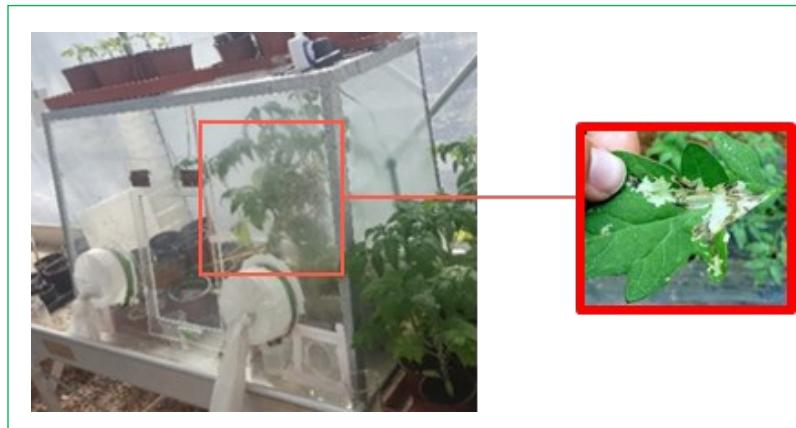


Figure 65: Infestation des tomates avec des larves de *T. absoluta* pour induire la biosynthèse de la molécule TDHC spermine.

#### 3.3.2. Lyophilisation des échantillons et broyage

Les échantillons sont lyophilisés puis broyés dans un broyeur à bille (Retsch MM400). Deux billes sont déposées dans chaque pilulier et la vitesse de broyage est réglée à 30 rpm pendant 45 secondes pour les feuilles et 1 minute pour les tiges. Les piluliers sont ensuite bien fixés et équilibrés dans les bras du broyeur (Figure 66). Une fois que les échantillons sont transformés en poudre, les billes sont retirées des piluliers grâce à une baguette magnétique, puis elles sont nettoyées à l'eau et à l'alcool avant d'être séchées et réutilisées. Les poudres sont ensuite conservées à température ambiante dans une armoire.

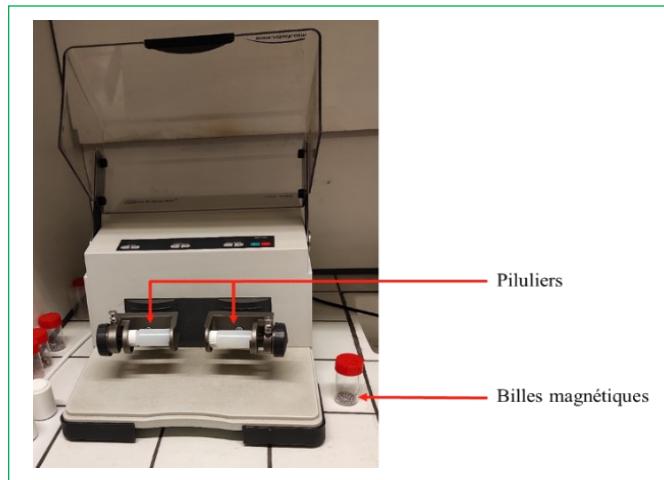


Figure 66: Broyage des échantillons avec le broyeur à bille.

### 3.3.3 Extraction des composés phénoliques à partir des échantillons lyophilisés

L'extraction est réalisée dans du méthanol à partir de 6g de poudre dans des tube Falcon de 50mL. L'extraction consiste à suspendre les 6g dans 15mL de méthanol 60%, puis à incuber ce mélange une nuit à température ambiante. Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est récupéré et le culot re-suspendu à part dans 10mL de méthanol 60% à température ambiante pendant une journée. Les surnageants récupérés après centrifugation (pendant 10 minutes à 13000 rpm) sont ajoutés aux autres surnageants récupérés et conservés à -20°C.

### 3.3.4. Purification de N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine par HPLC

Les échantillons extraits dans le **paragraphe 3.2.3.** sont passés au speed vac pour évaporer le méthanol pendant 6h. Les solutions sont ensuite injectées dans une HPLC semi-préparative (5mL/injection). L'analyse commence avec une phase mobile (polaire) composée de 90% de H<sub>2</sub>O (+ 0.1% acide formique) / 10% de méthanol (+ 0.1% acide formique), pour arriver à une composition de 90% de méthanol (+ 0.1% acide formique) / 10 % de H<sub>2</sub>O (+ 0.1% acide formique). Le volume d'injection est 5 mL. La molécule recherchée, N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine, a un temps de rétention de 3,55 minutes. Le temps de rétention est basé sur le profil UV d'intérêt qui apparaît à 3,55 minutes. La molécule est récupérée. Plusieurs injections sont réalisées pour augmenter la quantité de molécule collectée. Les volumes contenant la molécule sont combinés et lyophilisés et la poudre récupérée. La purification est réalisée en collaboration avec le laboratoire Libio sur la plateforme PASM (Plateau d'Analyse Structurale et Métabolomique) de l'ENSAIA.

### 3.4. Chimiosynthèse de N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine

La chimiosynthèse de la molécule est réalisée par Michel Boisbrun (L2CM). Elle se base sur les travaux de Yingyongnarongkul et al. (2008) qui utilisent l'extraction en phase organique solide. Le principe de la synthèse repose sur deux étapes essentielles. La première consiste à préparer le groupement polyamine, dans notre cas c'est la spermine, pour recevoir les groupements d'acide caféïque à des sites bien précis et protéger ces sites. La molécule protectrice utilisée est la 2-acétyldimedone (Dde). La deuxième étape permet de remplacer les molécules Dde par des groupements d'acide caféïques. Cela est faisable en fixant le produit purifié sur une résine active de carbonate et en réalisant plusieurs étapes de lavage avec 5% de  $N_2H_4$  dans du DMF (DiMéthylFormamide) pour éliminer les molécules Dde. La résine de Wang est traitée ensuite avec la solution d'acide caféïque pendant 12h pour coller les groupements acides. La résine est ensuite traitée avec 20% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pendant 2h, et la suspension filtrée. Enfin, la résine est lavée avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, et la solution de lavage est ajoutée à la solution filtrée. Le solvant est ensuite évaporé du mélange pour obtenir *in fine* la molécule purifiée en poudre (Figure 67).

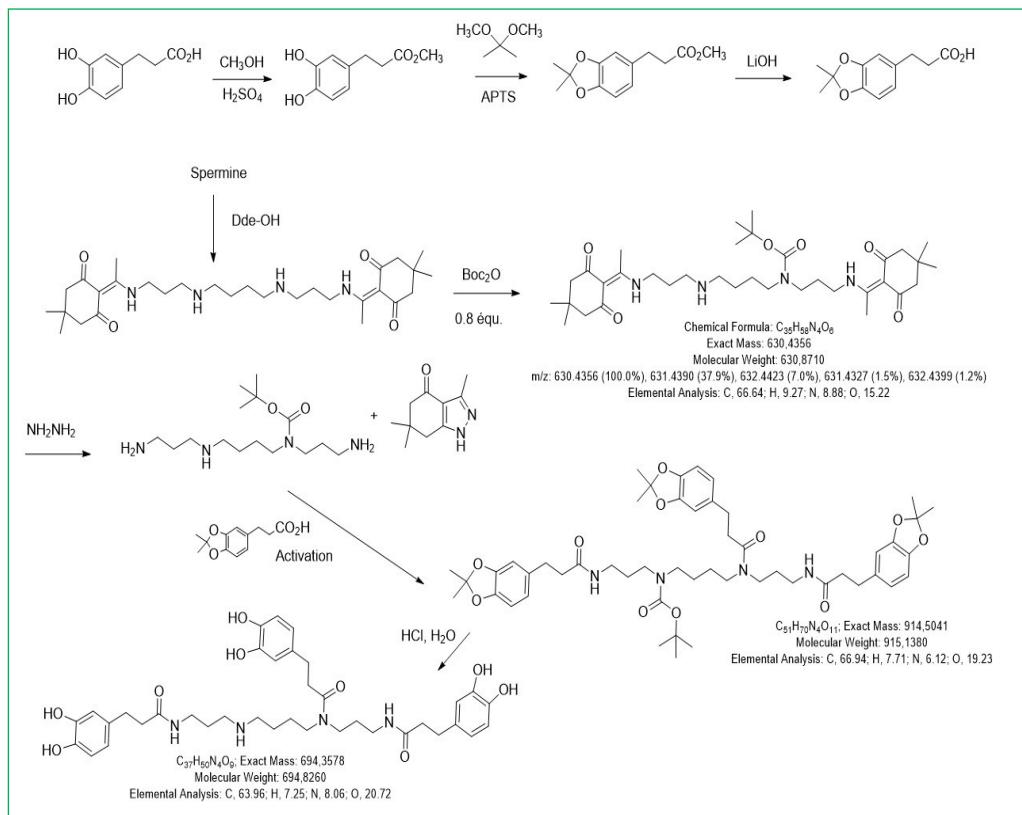


Figure 67: Synthèse de TDHC spermine (*N*1, *N*5, *N*14-tris-(dihydrocaféoyl)spermine. Dde: 2-acétyldimedone, APTS: acide paratoluènesulfonique.

### 3.5. Tests antibactériens

Les tests antibactériens sont réalisés par la méthode de « Broth dilution tests » (Jorgensen and Turnidge, 2015), par notre partenaire Arnaud Risler (plateforme ABC, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine). Le principe de cette méthode est de préparer plusieurs dilutions de la molécule testée dans un milieu qui permet la croissance des bactéries, dans les puits d'une plaque stérile (plaque de 96 puits). Il faut ensuite inoculer ces dilutions par la souche de bactérie testée, puis incuber le tout à 37°C pendant 24h. La turbidité de la solution est examinée pour détecter la croissance des bactéries dans le milieu. La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est déterminée par un dispositif de visualisation pour l'inspection de la croissance dans chacun des puits. Elle correspond à la plus faible concentration de la molécule, ne présentant pas de croissance bactérienne. Les micro-dilutions sont réalisées en milieu Mueller-Hinton 2 dans un volume final de 100µL. Les molécules testées sont diluées dans de l'eau pour préparer une solution de 4096 mg/L, à partir de laquelle une gamme de dilutions successives de ratio 1/2, de 1024 à 4 mg/L ont été testés. L'inoculum bactérien a été réalisé afin d'obtenir une concentration finale de  $5.10^5$  UFC (Unité Formant Colonie)/mL (Jorgensen and Turnidge, 2015). La détection de la croissance a été effectuée à 24h par observation de la présence ou absence de croissance dans les puits. Chaque essai est répété 8 fois. Les témoins réalisés sur chaque plaque sont : témoin milieu seul, témoin milieu + échantillon et témoin bactéries (témoin de croissance) (Jorgensen and Turnidge, 2015).

### 3.6. Tests anti-inflammatoires

Le LPS (lipopolysaccharide des bactéries Gram (-)) induit une réponse inflammatoire caractérisée entre autres par la synthèse et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ ) par les cellules immunitaires possédant le récepteur au LPS. La concentration de ces cytokines dans le milieu de culture des cellules est proportionnelle à l'inflammation. Notre objectif est d'identifier si les molécules/extrats que nous possédons sont capables d'inhiber la production de ces cytokines. Pour cela, il faut donc utiliser un stimulus classique comme le LPS puis rajouter la molécule/l'extrait 1h après pour voir si cette molécule/extrait rajouté est capable de s'opposer à la pro-inflammation déclenchée par le LPS. D'autre part, nous avons aussi recherché si la molécule/l'extrait était capable de mettre les cellules immunitaires dans un état anti-inflammatoire : la molécule/l'extrait a donc été ajoutée au milieu de culture des cellules immunitaires puis 1h après, le LPS a été rajouté. Les tests anti-inflammatoires sont réalisés par Armelle Ropars (Laboratoire SIMPA).

### 3.6.1. Obtentions des macrophages humains

La lignée THP-1 (lignée promonocytaire de leucémie humaine) est cultivée à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI 1640 auquel sont ajoutés, du sérum de veau fœtal à 10% décomplémenté, du pyruvate de sodium à 1mM, des acides aminés non essentiels 1x, de la L-glutamine à 2mM, de la pénicilline à 100 U/mL et de la streptomycine à 100 µg/mL. Les monocytes sont différenciés en macrophages dans des plaques 24 puits à une concentration de 0.8 million de monocytes/mL par ajout du PMA (phorbol myristate acétate) à 20nM au milieu de culture. Après 72h, les différents tests peuvent être alors effectués.

### 3.6.2. Incubation des macrophages avec les extraits/LPS

Les macrophages préparés comme indiqué dans **le paragraphe 3.6.1** sont incubés avec différentes solutions présentées dans le **Tableau 21**. Les 4 extraits bruts de tomate contiennent un mélange de composés phénoliques, dont de l'acide chlorogénique (thèse de Victoire Coqueret 2017). Ce dernier présente des activités anti-inflammatoires décrites dans la littérature et dans les extraits, il constitue environ 30% des polyphénols dont il est la molécule majoritaire. Il va donc servir de témoin pour les fractions d'extrait brut. Les 3 concentrations des extraits bruts utilisées (50, 100, 150 µg/mL) contiennent donc 30 % d'acide chlorogénique, ce qui correspond respectivement à 15, 30 et 45 µg/mL d'acide chlorogénique : ce sont donc ces concentrations qui vont être choisies comme référents. Cinq expériences ont été réalisées avec pour chaque expérience, trois répétitions de chaque traitement. Après 3 jours de différenciation, les macrophages sont incubés pendant 24h avec 100 ng/mL de LPS ajouté 1h avant ou 1h après l'une des fractions MR ou l'acide chlorogénique. Après incubation, les surnageants de culture cellulaire sont récupérés et conservés à -80°C pour d'éventuels tests (tests ELISA) et les cellules sont soumises à un test de viabilité (test au cristal violet).

Tableau 21: Solutions d'incubation et traitement des macrophages.

Produits	Concentration finale	Solvant	description
<b>LPS (lipopolysaccharide)</b>	100 ng/mL	RPMI 1640	Inducteur classique de stress cellulaire. Induit une réponse pro-inflammatoire. Contrôle positif.
<b>Acide chlorogénique (CA)</b>	15 (= 42,37 µM), 30, 45 µg/mL	RPMI 1640	Molécule connue pour avoir des propriétés légèrement anti-inflammatoires. Constituant polyphénolique majoritaire dans les MR. Permettra de comparer l'activité des MR à CA.
<b>LN-T</b>	50, 100, 150 µg/mL contenant à peu près 30% d'acide chlorogénique d'où les 15, 30, 45 µg/mL de CA utilisés.	RPMI 1640	Extraits bruts utilisés comme produits à tester
<b>LN+T</b>			
<b>HN-T</b>			
<b>HN+T</b>			
<b>Caféoylputrescine</b>	15, 30, 45 µM	RPMI 1640	Molécule pure achetée (chimio synthèse) utilisée comme produit à tester
<b>Kukoamine A</b>			

### 3.6.3. Tests de cytotoxicité cellulaire avec le cristal violet

Avant d'étudier un effet anti-inflammatoire éventuel des extraits, il faut déjà analyser la viabilité des cellules en présence des différentes concentrations d'extraits. Le test au cristal violet permet de déterminer le % de viabilité. Celui-ci se fixe à l'ADN des cellules vivantes en leur donnant une coloration violette que l'on peut analyser par spectrophotométrie. La D.O. obtenue est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes et le 100% correspond à la D.O. obtenue avec des cellules non traitées. De façon plus précise, pour réaliser le test, le surnageant de culture des macrophages est retiré puis congelé à -80°C en vue de tests ELISA. Les macrophages qui sont des cellules adhérentes, vont être lavées deux fois délicatement avec du tampon PBS (= phosphate buffer saline) afin d'éliminer les cellules mortes et le restant de milieu de culture cellulaire. Le tampon PBS est enlevé puis 0.5mL de cristal violet 0.05% est ajouté dans chaque puits. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques sont lavées 3 fois doucement avec de l'eau distillée puis mises à sécher à température ambiante. Ensuite, 0.5mL d'acide acétique 10% est ajouté dans chaque puits pour lyser les macrophages. Ceci va permettre de solubiliser l'ensemble. Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, 100 µL de ce lysat est disposé dans une plaque 96 puits pour être ensuite lu au spectrophotomètre à la D.O. à 595 nm.

### 3.6.4. Technique ELISA et détermination de la production de TNF $\alpha$ des THP-1 différenciées

Les surnageants de culture des macrophages traités pendant 24h avec les fractions MR+LPS ou avec l'acide chlorogénique + LPS vont donc servir, entre autres, à analyser la production de TNF $\alpha$ . Le kit utilisé provient de chez RnD Systems (BioTechne) et est basé sur la technique ELISA

en « sandwich ». Des anticorps anti-TNF $\alpha$  sont donc immunoabsorbés par le fournisseur sur la plaque puis les surnageants de culture sont déposés dans les puits. Après une incubation à température ambiante de 2h, la plaque est lavée puis un anticorps anti-TNF $\alpha$  couplé à une peroxydase est ajouté. Après 2h d'incubation suivie de lavages, le substrat de l'enzyme est rajouté. Après 20 minutes de réaction enzymatique, la réaction est stoppée par ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré et la plaque est alors lue au spectrophotomètre à une D.O. de 450 nm.

### 3.7. Modification des conditions de cultures des tomates

Nous avons réalisé des expériences visant à optimiser les conditions de culture permettant d'augmenter la teneur en phénolamides dans la biomasse. Dans une première expérience, nous avons utilisé 20 plantes de tomate de même âge (21 jours après germination), parmi lesquelles 10 sont mises en culture hydroponique et 10 dans de la terre. Cinq plantes de chaque système de culture sont infestées au niveau de leur deuxième feuille par 6 larves de *T. absoluta* pendant 4 jours. Ensuite, nous avons réalisé une extraction de composés phénoliques sur les feuilles 'locales'<sup>6</sup> infestées par *T. absoluta*, les feuilles 'systémiques'<sup>7</sup>, ainsi que les tiges 'systémiques' (**paragraphe 4.9 du chapitre 2**). Ensuite nous avons analysé la teneur de ces feuilles en CP (Caféoylputrescine), DHC spermidine (N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine), TDHC spermine (N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine) et kukA/B (Kukoamine A/B).

Dans une deuxième expérience, nous avons utilisé des plantes de tomates de différents âges (20, 30, 40 et 50 jours après germination). Ces plantes étaient cultivées en serre dans du terreau. Nous avons ensuite infesté chacune des plantes avec 6 larves (3 répétitions par traitement). Nous avons ensuite extrait les composés phénoliques que nous avons analysés à l'UPLC.

### 4.8. Analyses statistiques

La normalité des valeurs obtenus pour les différents traitements est validée en traçant l'histogramme de distribution. La moyenne des répétitions de chaque traitement, les variances, les écart-types et les erreurs standards sont calculés. Les moyennes sont représentées sur les histogrammes et les erreurs standards sont utilisés comme barre d'erreurs. La significativité des différences observées est calculée en utilisant le « Student test ou T.test » et la valeur de p est ainsi déterminée. Les moyennes sont significativement différentes à P<0.05.

---

<sup>6</sup> Les tissus locaux sont ceux où a eu lieu le site d'herbivorie.

<sup>7</sup> Les tissus systémiques représentent les tissus où il n'y a pas eu l'action physique de l'herbivorie.

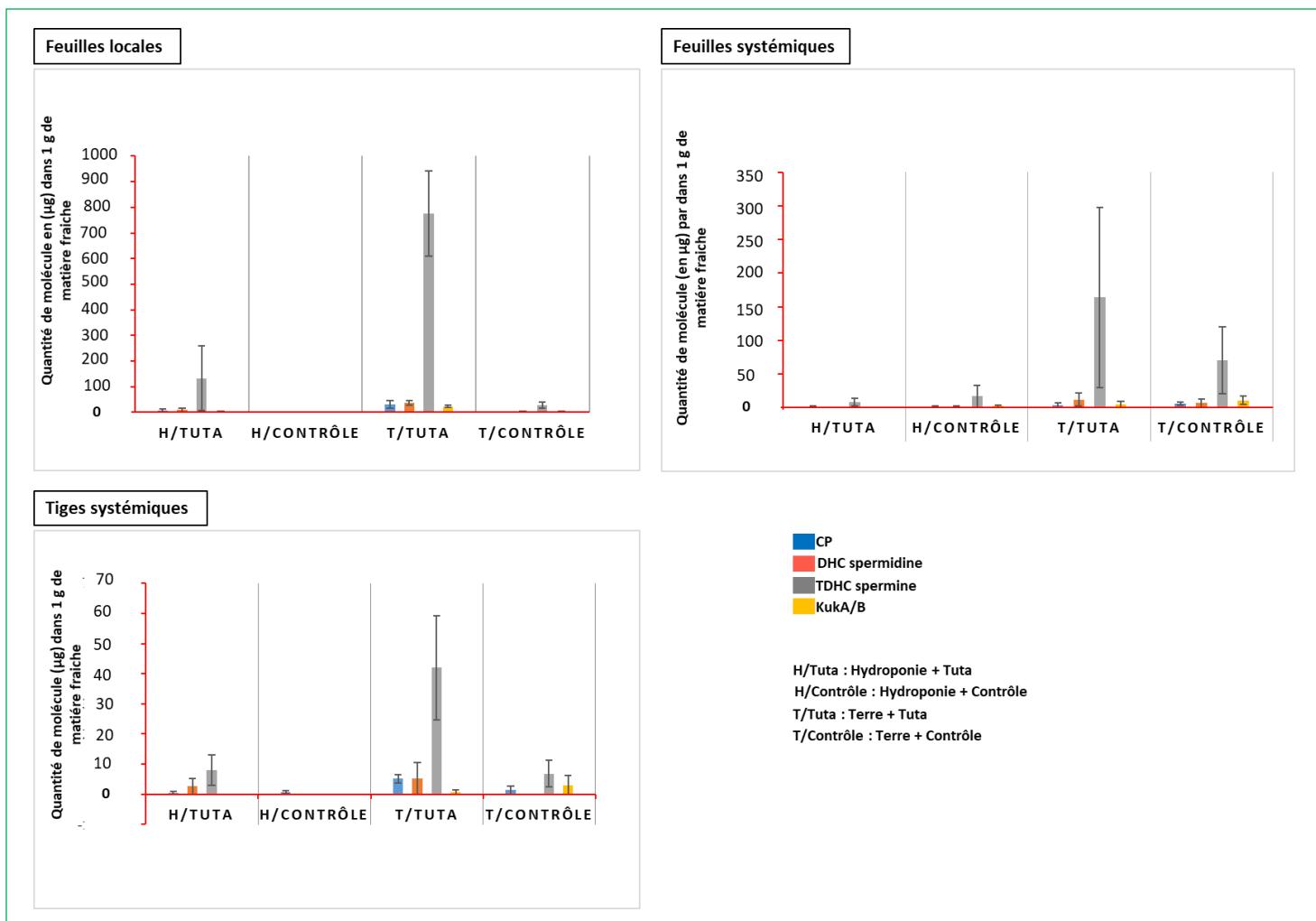
## 4.Résultats

### 4.1. Synthèse du N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine par la tomate

La molécule TDHC spermine est la plus accumulée dans les tissus des tomates infestées par *T. absoluta* (**Tableau 18**). Ainsi, son extraction et sa purification à partir des plantes infestées est possible. Les travaux précédents (thèse de Victoire Coqueret 2013-2017) ont montré que l'accumulation maximale des phénolamides dans les feuilles des tomates se produit en présence d'une charge larvaire de 12 larves/feuilles, en comparaison d'essais réalisés avec 1 ou 6 larves par feuille. Les plantes utilisées dans les travaux de la thèse de Victoire sont jeunes (21 jours après germination) et cultivées en hydroponie. Pour nos travaux, le passage vers la culture en terre, et l'utilisation des plantes plus âgées avec un plus grand nombre de biomasse générée nous paraissaient plus pratiques et faciles. La question se pose sur l'optimisation (i) des conditions de culture et (ii) de l'âge des plantes convenable pour une accumulation maximale en phénolamides.

#### 4.1.1. Optimisation des conditions de cultures

J'ai comparé l'impact du mode de culture (terre vs. hydroponie) sur la capacité d'accumulation en phénolamides des tissus de tomates soumis à l'herbivorie (**paragraphe 3.7**). Les résultats montrent une accumulation très élevée des 4 phénolamides mesurés (CP, DHC spermidine, TDHC spermine, KukA/B) dans les plantes cultivées en terre par rapport à celles cultivées en hydroponie (**Figure 68**) et par rapport aux plantes témoins non-infestées. De plus, les feuilles infestées et les tiges des plantes cultivées en terre qui sont infestées par *T. absoluta* ont montré une plus forte accumulation de la CP par rapport à celles non infestées. TDHC est plus accumulée dans les feuilles que dans les tiges des plantes en terre infestées par *T. absoluta* (**Figure 68**). Cela nous permet de valider l'utilisation de la culture en terre plutôt qu'en hydroponie pour augmenter la teneur en phénolamides de la biomasse des plantes infestées.

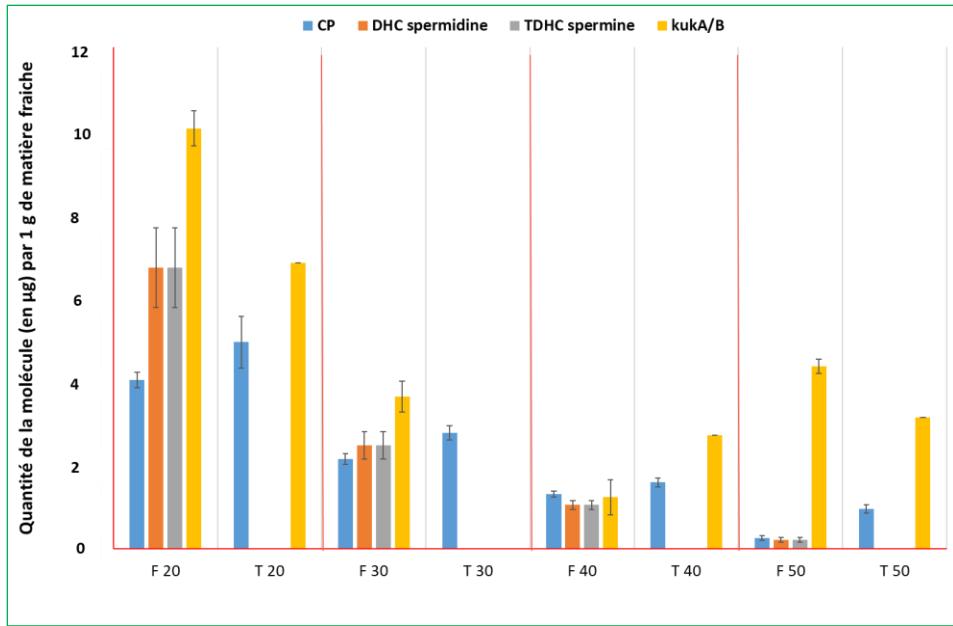


**Figure 68 :** Comparaison de l'accumulation des phénolamides dans les différentes parties des plantes infestées par *T. absoluta* en fonction du substrat de culture (hydroponie H ou terre T) en comparant avec des plantes témoins de chaque système de culture, non infestées. CP (Caféoylputrescine), DHC spermidine (N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine), TDHC spermine (N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine) et KukA/B (Kukoamine A/B). Locales : tissus où a lieu l'herbivorie, systémique : les tissus non impactés physiquement par l'herbivorie.  $P < 0.05$ .

#### 4.1.2. Optimisation de l'âge de plantes

Le but de cette expérience est d'optimiser l'âge des plantes qui permet d'obtenir le plus d'accumulation des phénolamides dans la biomasse des plantes infestées en suivant la méthode décrite dans le **paragraphe 3.7**. Les résultats ont montré que les plantules accumulent le plus de phénolamides 20 jours après germination, dans les feuilles ainsi que dans les tiges. Leur concentration diminue chez les plantes plus âgées (**Figure 69**).

En conséquence, pour la suite des expérimentations, nous avons infesté des jeunes plantes de tomate de 20 jours, cultivées en terre, avec au moins 6 larves, afin d'obtenir une biomasse enrichie en phénolamides (**paragraphe 3.3.1**).

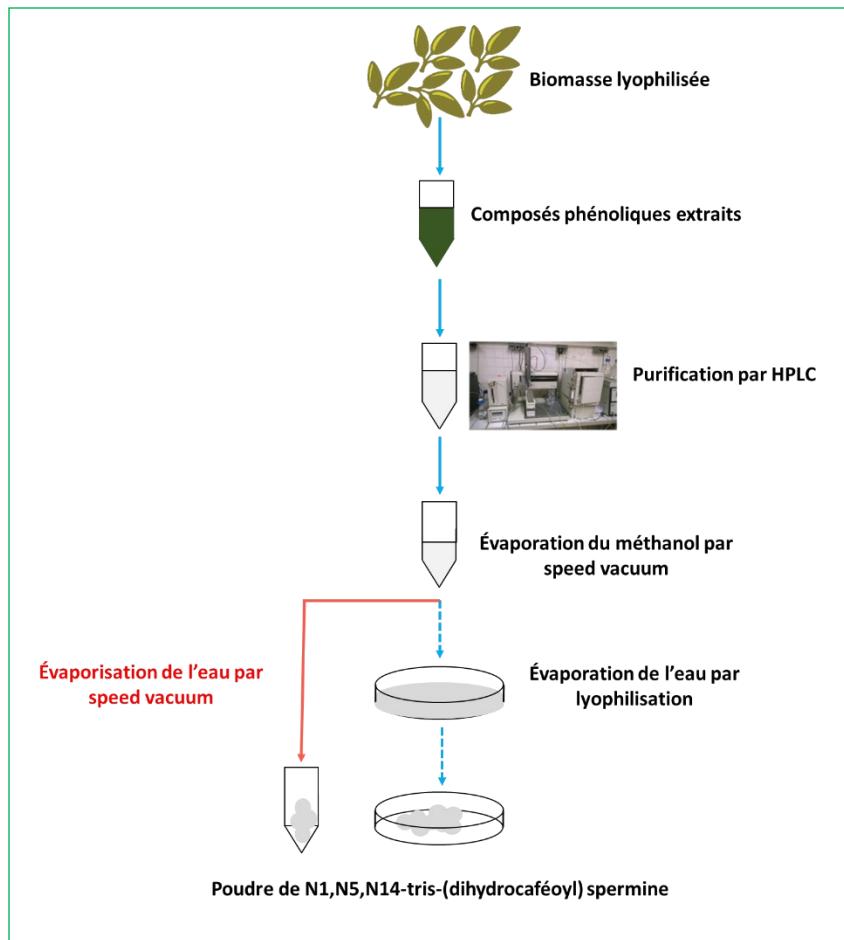


**Figure 69:** Accumulation des phénolamides dans les feuilles (F) et les tiges (T) des plantes infestées par *T. absoluta* à différents âges : 20 jours, 30 jours, 40 jours et 50 jours après germination. CP (Caféoylputrescine), DHC spermidine (*N*1, *N*10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine), TDHC spermine (*N*1,*N*5,*N*14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine) et kukA/B (Kukoamine A/B).  $p < 0.05$

#### 4.1.3 Purification de N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine issue de plantes

La TDHC spermine a été purifié en HPLC-semi-préparative. Cette molécule que l'on suit en général en spectrométrie de masse, est aussi observable avec une détection à 280nm par la formation d'un petit pic.

Après purification par HPLC, les fractions qui contenaient la molécule sont constituées de méthanol et d'eau. Afin d'obtenir la molécule sous forme de poudre, nous évaporons le méthanol au speed vac et nous éliminons l'eau par lyophilisation. A l'issue de ces différentes étapes de purification, seule une petite quantité de TDHC spermine est identifiée dans la poudre, représentant à peine 10% de la quantité attendue. Nous avons déterminé à quelle étape du processus de purification la molécule se perd. Les analyses à l'UPLC-MS après chaque étape de purification ont montré que c'est à l'étape de lyophilisation que se situe le problème, avec plus de 90% de la molécule perdue à cette étape. Nous avons remplacé la lyophilisation par une élimination de l'eau au speed vac (Figure 70). Cela permet de récupérer l'intégralité de la molécule injectée au départ.



**Figure 70:** Différentes étapes d'obtention de la molécule N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine sous forme de poudre à partir de biomasse lyophilisée. L'étape d'évaporation de l'eau par lyophilisation est remplacée par l'évaporation au speed vac. En bleu, les étapes initiales du protocole. Les flèches bleues pointillés représentent les étapes qui sont éliminées.

Au final, à partir d'1kg (MS) de plante, nous avons récupéré environ 3mg de molécule pure. Ce faible rendement s'explique en partie par la perte importante rencontrée au moment de la lyophilisation.

Les tests d'activité thérapeutique nécessitent de 10 à 20 mg de molécule pure. Aussi, compte-tenu des exigences expérimentales et du faible rendement en molécule obtenu à partir des plantes, avons nous pris la décision d'arrêter nos investigations à ce stade pour ce qui concerne l'obtention de phénolamides d'intérêt à partir de plantes et de changer de stratégie pour les tests. Notre collègue chimiste a essayé de produire la TDHC spermine par synthèse chimique comme décrit dans le **paragraphe 3.4**. La tentative de synthèse a commencé depuis plus d'un an ; elle s'est avérée complexe à cause d'un problème de stabilité de la molécule. Notre étude s'est alors focalisée sur deux molécules, la kukA et la CP, disponibles dans le commerce, ainsi que sur des extraits bruts de feuilles accumulant différemment des phénolamides (LN-T, LN+T, HN-T, HN+T).

### 4.3. Tests antibactériens de kukoamine A, de CP et de phénolamides présents dans des extraits bruts de feuilles

Les tests antibactériens sont réalisés en suivant les étapes décrites dans le **paragraphe 3.5** à partir de 5 mg de la poudre des extraits brut de tomate sous faible nutrition azotée sans *T. absoluta* (LN-T), tomate sous faible nutrition azotée avec *T. absoluta* (LN+T), tomate sous forte nutrition azotée sans *T. absoluta* (HN-T), et tomate sous forte nutrition azotée avec *T. absoluta* (HN+T), en plus de 5 mg des deux molécules pures kuk A et CP.

Aucune activité antibactérienne est détectée pour les extraits bruts (LN-T, LN+T, HN-T et HN+T) à des concentrations en dessous de 1024mg/L. En revanche, les tests réalisés sur la kuk A et la CP montrent une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* à des concentrations de 256 mg/L pour la kuk A et 512 mg/L pour la CP (). La kuk A présente également une activité antibactérienne (MIC=512 mg/L) contre *Acinetobacter baumannii*, et une activité bactérienne faible (MIC = 1024 mg/L) contre la majorité des autres bactéries testées (**Tableau 22**). La CP montre une activité inhibitrice sur *Enterococcus faecalis* à 1024 mg/L. De manière générale, les concentrations auxquelles les deux phénolamides inhibe la croissance bactérienne révèlent des activités antimicrobiennes faibles (MIC=1024mg/L) à modérées (MIC>256 mg/L).

*Tableau 22:* Activités antibactériennes de la kukoamine A et de la caféoylputrescine.

Souche bactérienne	Kukoamine A (mg/L)	Caféoylputrescine (mg/L)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>256</b>	<b>512</b>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<b>1024</b>	1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>1024</b>	>1024
<i>Escherichia coli</i>	<b>1024</b>	>1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1024	>1024
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<b>512</b>	>1024
<i>Enterobacter cloacae</i>	<b>1024</b>	>1024

#### Activité antibactérienne en fonction des concentrations de la molécule:

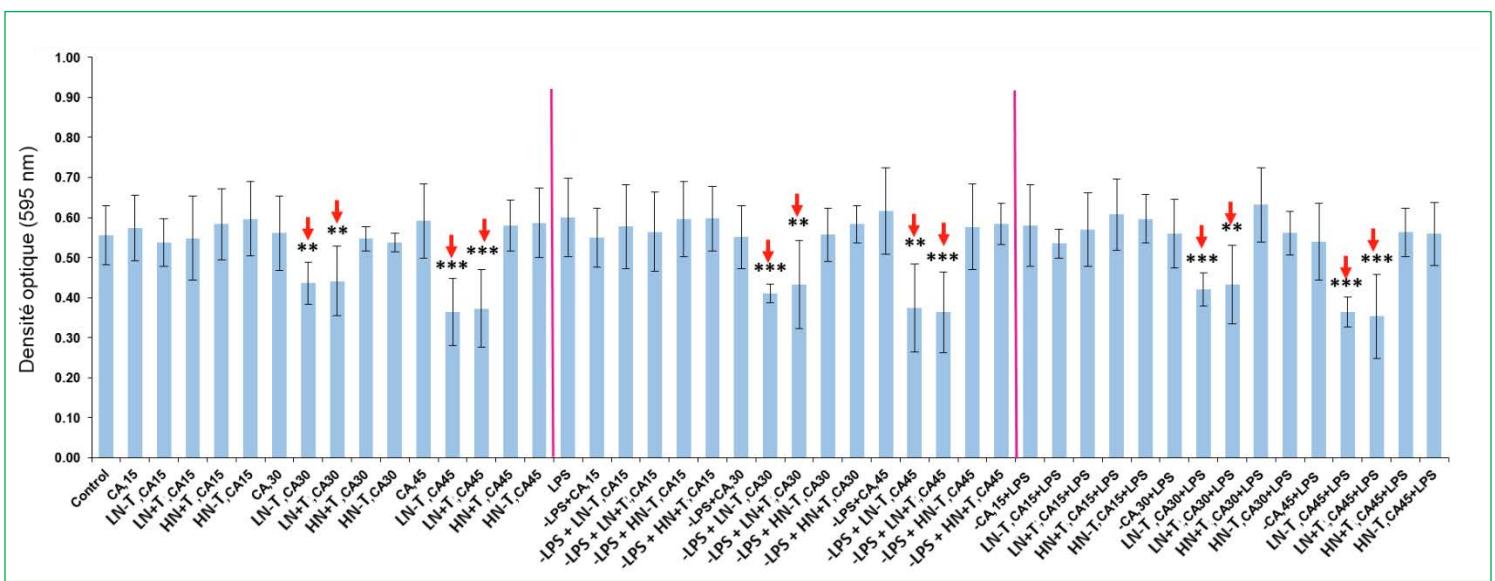
[Molécule] ≤64mg/L : forte activité  
 64mg/L < [molécule] <1024 mg/L: activité modérée  
 [Molécule] = 1024 mg/L : faible activité  
 [Molécule] > 1024 mg/L : Pas d'activité

#### 4.4. Tests de cytotoxicité et anti-inflammatoire sur les cellules THP-1 différenciées en macrophages

#### 4.4.1. Tests de cytotoxicité et tests anti-inflammatoires avec les extraits bruts

Des différences de viabilité des macrophages au cristal violet sont observées entre les 4 fractions après incubation avec différentes concentrations des extraits bruts (50, 100 et 150 µg/mL) ( ). L'incubation des macrophages avec la fraction HN-T ou HN+T ne montre aucune cytotoxicité, quelle que soit la concentration utilisée. Les fractions LN-T et LN+T montrent une baisse de 20-25% de la viabilité, dès la concentration 100 µg/mL, correspondant à la présence de 30 µg/mL d'acide chlorogénique. Ces fractions sont donc cytotoxiques dès cette concentration. Le LPS utilisé à 100 ng/mL n'exerce pas d'effet cytotoxique sur les THP-1.

Si ces mêmes fractions sont ajoutées avant ou après le LPS, le % de cytotoxicité ne change pas : les fractions HN-T et HN+T n'ont pas d'effet cytotoxique alors que les fractions LN-T et LN+T restent cytotoxiques et ce, dans les mêmes proportions que lorsqu'elles sont utilisées seules (**Figure 71** ).

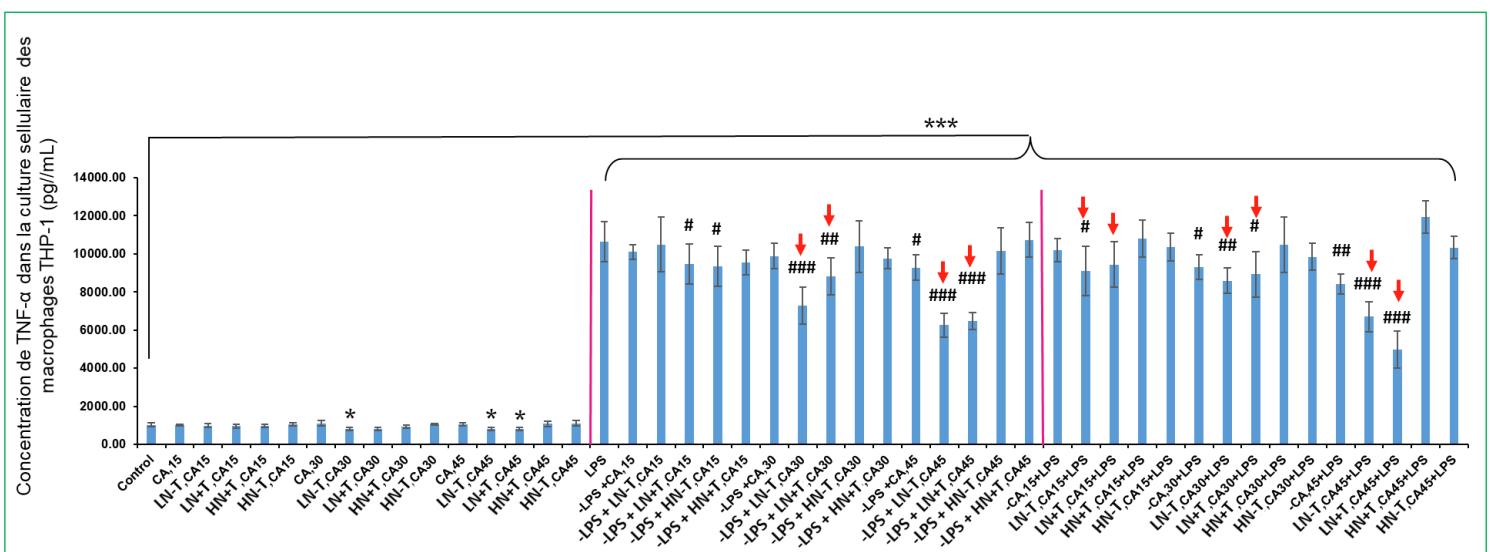


**Figure 71:** Résultats des tests de viabilité au cristal violet. La densité optique (D.O.) provient du relargage du cristal violet par les macrophages vivants après les avoir incubés 24h avec différents traitements : acide chlorogénique ou fraction d'extrait brut à différentes concentrations, LPS seul ou LPS ajouté avant ou après l'acide chlorogénique ou la fraction extract brut. CA : acide chlorogénique. Le signe – représente le traitement appliqué en premier sur les macrophages. Le signe + indique le traitement appliqué en deuxième sur les macrophages. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Cette expérience a été réalisée 3 fois et à chaque fois, avec 8 répétitions par traitement.

Quelle que soit la concentration de HN-T ou de HN+T utilisée, il n'y a pas de différence avec la production de TNF $\alpha$  générée par les cellules témoins non traitées ( **Figure 72**). Pour les

extraits bruts LN-T et LN+T, on observe une diminution de 20-25% de la production de TNF- $\alpha$  dès la concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , correspondant à 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'acide chlorogénique. Cette diminution du pourcentage est identique à celle obtenue avec les tests au cristal violet ( et **Figure 72**).

Pour les fractions HN-T et HN+T, il n'y a pas de différence avec la production de TNF $\alpha$  provoquée par le LPS seul, quelle que soit leur concentration et l'ajout de la fraction avant ou après le LPS ( **Figure 72** ). Notons une seule exception, correspondant au traitement « LPS puis HN-T à 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  », soit 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'acide chlorogénique. Cela témoigne d'un très léger effet anti-inflammatoire qui s'estompe quand la concentration augmente. Pour la fraction LN-T la production de TNF $\alpha$  diminue à la concentration de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (correspondant respectivement à 30 et 45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'acide chlorogénique), ajoutée avant ou après le LPS. Le même effet est observé avec la fraction LN+T ( **Figure 72** ). Par contre, on observe un effet anti-inflammatoire non significatif, de cette fraction, à la concentration de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'acide chlorogénique) quand le LPS est mis avant ou après la fraction (observée aussi avec LN+T mais non significatif) ( **Figure 72** ).



**Figure 72:** Résultats des tests ELISA concernant la production de TNF- $\alpha$  dans des surnageants de culture cellulaire où les macrophages ont été incubés 24h avec de l'acide chlorogénique ou des extraits bruts à différentes concentrations ou avec du LPS seul ou du LPS ajouté avant ou après l'acide chlorogénique ou l'extrait brut. CA : acide chlorogénique. Le signe – représente le traitement appliqué en premier sur les macrophages. Le signe + indique le traitement appliqué en deuxième sur les macrophages. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ : par rapport au témoin CA. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ : par rapport au LPS. Cette expérience a été réalisée 3 fois et à chaque fois, avec 8 répétitions par traitement.

#### 4.4.2. Tests de cytotoxicité et tests anti-inflammatoires avec la caféoylputrescine et la kukoamine A

La CP et la kuk A ont été testées à 3 concentrations : 15, 30 et 45  $\mu$ M, classiquement utilisées dans la littérature sur des lignées cellulaires. Lorsque les macrophages sont incubés avec la CP, les tests au cristal violet ne montrent aucun impact sur la viabilité cellulaire avec les concentrations utilisées (Figure 73). De la même façon, cette molécule ajoutée avant ou après le LPS dans le milieu de culture des cellules n'a aucun impact sur la viabilité des macrophages au bout de 24h d'incubation à aucune des concentrations utilisées (Figure 73).

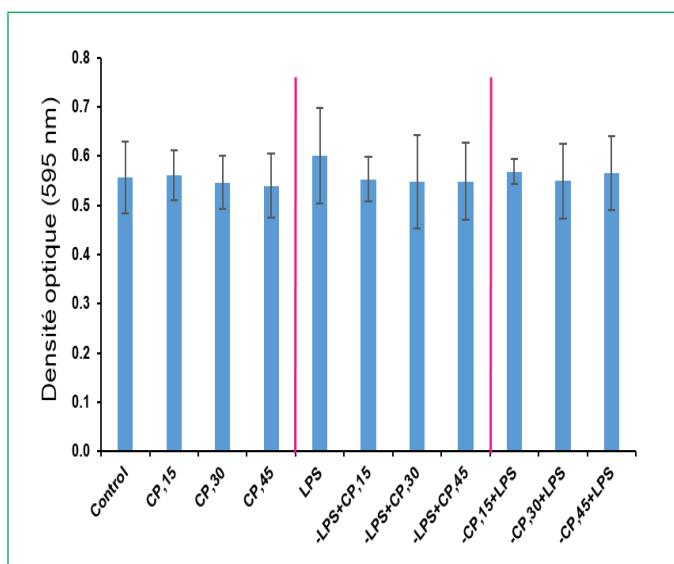
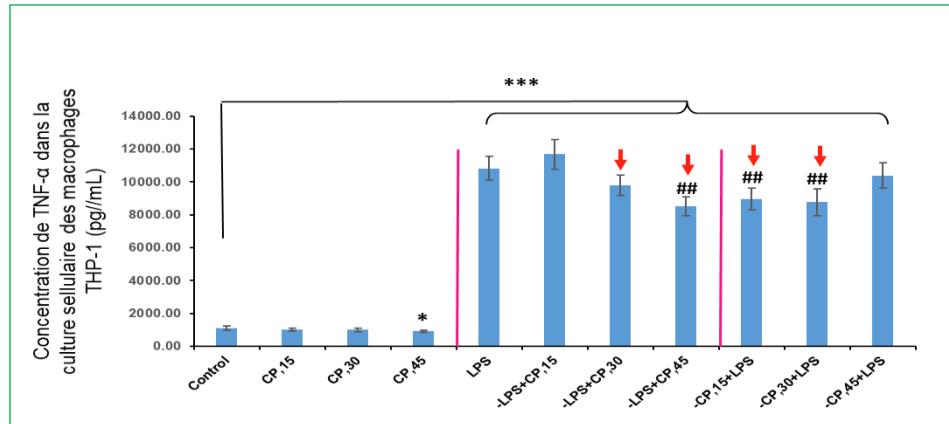


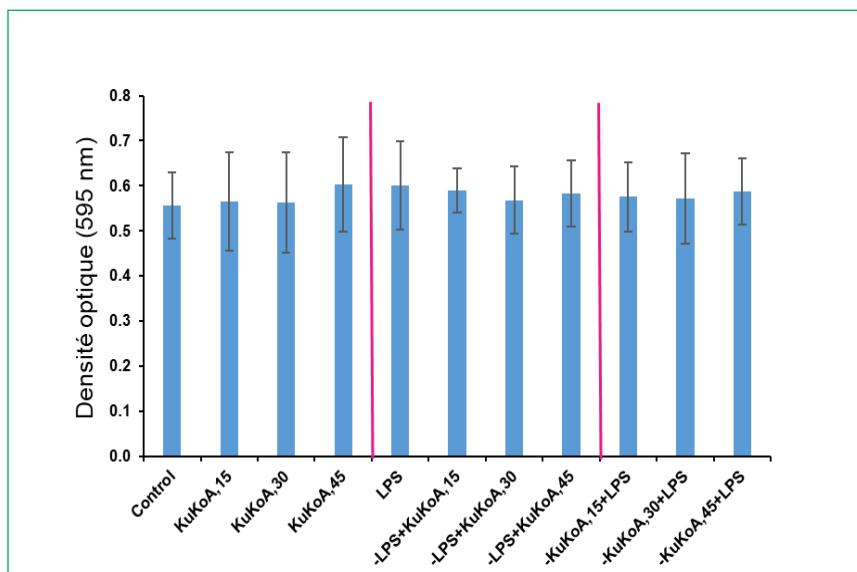
Figure 73: Résultats des tests de viabilité au cristal violet. La densité optique (D.O.) provient de la libération du cristal violet par les macrophages vivants après incubation 24h avec la caféoylputrescine (15, 30 et 45  $\mu$ M) ou avec le LPS seul ou avec le LPS ajouté avant ou après la caféoylputrescine. CA: acide chlorogénique. CP: caféoylputrescine. Le signe – représente le traitement appliqué en premier sur les macrophages. Le signe + indique le traitement appliqué en deuxième sur les macrophages. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Cette expérience a été réalisée 3 fois et à chaque fois, avec 8 répétitions par traitement.

La CP exerce un léger effet anti-inflammatoire (-10%) à la concentration de 45  $\mu$ M par rapport aux cellules non traitées, montré par les tests ELISA (Figure 74). On observe une diminution dose-dépendante de la production de TNF- $\alpha$  (respectivement de 10 et de 22%), lorsque les macrophages sont incubés avec le LPS et qu'une heure après, on ajoute la CP à 30 ou à 45  $\mu$ M (Figure 74).



**Figure 74:** Résultat des tests ELISA concernant la production de TNF $\alpha$  provenant de surnageants de culture cellulaire où les macrophages ont été incubés 24h avec la caféoylputrescine (15, 30 et 45  $\mu$ M) ou avec le LPS seul ou avec le LPS ajouté avant ou après la caféoylputrescine. Le signe – représente le traitement appliqué en premier sur les macrophages. Le signe + indique le traitement appliqué en deuxième sur les macrophages. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ : par rapport au témoin CA. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ : par rapport au LPS. Cette expérience a été réalisée 3 fois avec 8 répétitions par traitement.

Les tests au cristal violet montrent que lorsque les macrophages sont incubés avec la KukA, leur viabilité cellulaire reste identique à celle des cellules non traitées et ce, quelle que soit la concentration utilisée (Figure 75). De la même façon, si cette molécule est ajoutée avant ou après le LPS dans le milieu de culture des cellules, elle a aucun impact sur la viabilité des macrophages au bout de 24h d'incubation à aucune des concentrations utilisées (Figure 75).



**Figure 75:** Résultats des tests de viabilité au cristal violet. La densité optique (D.O.) provient du relargage du cristal violet par les macrophages vivants incubés pendant 24h avec la kukoamine A (KukA) à 15, 30 ou 45  $\mu$ M ou avec le LPS seul ou avec le LPS ajouté avant ou après la kukoamine A. Le signe – représente le traitement appliqué en premier sur les macrophages. Le signe + indique le traitement appliqué en deuxième sur les macrophages. Cette expérience a été réalisée 3 fois avec 8 répétitions par traitement.

En présence de kukA, la production de TNF $\alpha$  des macrophages reste inchangée par rapport aux cellules non traitées (Figure 76). Lorsque les macrophages sont incubés en présence de LPS et de kukA, le niveau de production de TNF $\alpha$  reste identique à celui engendré par le LPS seul (Figure 76).

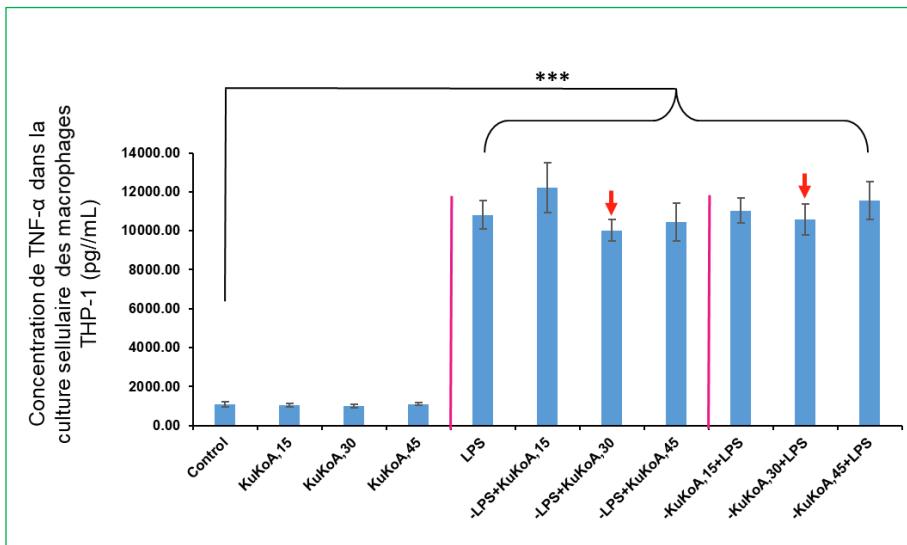


Figure 76: Résultat des tests ELISA concernant la production de TNF $\alpha$  provenant de surnageants de culture cellulaire où les macrophages ont été incubés 24h avec la kukoamine A (15, 30 et 45  $\mu$ M) ou avec le LPS seul ou avec le LPS ajouté avant ou après la kukoamine A. Le signe + indique le traitement appliqué en deuxième sur les macrophages. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ : par rapport au témoin CA. #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$ : par rapport au LPS. Cette expérience a été réalisée 3 fois avec 8 répétitions par traitement

## 5. Discussion

### 5.1. La N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine est apparue comme une molécule difficile à produire en quantité avec le système Tomate/ *T. absoluta*

Parmi les molécules synthétisées par la tomate en réponse à l'herbivorie de *T. absoluta*, le N1,N5,N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine constituait une molécule de fort intérêt en raison de sa structure proche de molécules bioactives connue (kukoamine) et de sa concentration assez forte dans les tissus de tomates infestées (de l'ordre de 1200mg/kg MS). Cela permettait d'envisager la purification de quantités suffisantes pour des tests de bioactivité. En dépit d'un travail d'optimisation des conditions de production, les essais conduits pour purifier cette molécule ne se sont pas révélés satisfaisants. Alors que nous pouvions nous attendre à purifier de l'ordre de 1g de molécule pure à partir de la biomasse dont nous disposions, nous avons réussi à purifier seulement 3mg, ce qui était bien insuffisant pour les tests d'activité biologique (10 à 20 mg de molécules nécessaire). Nous avons pu montrer que cette molécule est très instable, en particulier lors de

l'étape finale de lyophilisation. Ceci était plutôt inattendu dans la mesure où cette molécule partage avec la kukoamine la même structure avec en plus un groupement Caféoyl-CoA. Les kukoamines et notamment la kukoamine A et B sont des molécules généralement stables à différentes étapes de synthèse sur phase solide. J'ai également montré que ces molécules sont stables dans des conditions expérimentales très contrastées (après 4h sur glace, 3 cycles de congélation et décongélation, 180 jours à -80°C, après 3h à température ambiante) (Page et al., 1998; Li et al., 2015c; Zhao et al., 2016; Wang et al., 2017).

Après avoir constaté la difficulté d'obtenir cette molécule à partir de la biomasse, nous avons essayé de l'obtenir par le biais d'une synthèse chimique. Dans ce but, nous avons initié une collaboration avec un collègue chimiste du laboratoire L2CM, Michel Boisbrun, pour réaliser cette synthèse. La synthèse chimique n'est pas encore finalisée mais très bien engagée. Dans le détail, la synthèse chimique est basée sur les travaux de Yingyongnarongkul et al. (2008) pour la synthèse de bis, tris et tétra(dihydrocaféoyl)polyamine en phase solide. Elle a nécessité plusieurs tentatives d'optimisation et d'adaptation du protocole décrit dans cette publication. A l'heure actuelle, la molécule a pu être obtenue mais avec de très faible rendement et en mélange avec d'autres isomères. Plusieurs tentatives de purification sont en cours, mais une fois encore, cette étape s'avère critique en raison d'une forte instabilité de la molécule. A court terme, un lot d'une vingtaine de milligrammes devrait être disponible pour initier de premiers tests biologiques, mais un travail d'optimisation s'avère encore nécessaire pour envisager une production plus conséquente. Devant ce constat, d'autres alternatives peuvent encore être explorées. L'une d'elles serait de pouvoir synthétiser la molécule dans des systèmes hétérologues (bactérie, levure). Les travaux que j'ai conduits et qui sont présentés dans le chapitre 2 visaient à identifier une spermine N-acyltransférase qui serait très utile pour cette synthèse.

## 5.2. Les phénolamides testés présentent une faible activité antibactérienne

L'objectif était d'identifier des phénolamides de la tomate qui inhibent fortement la croissance des bactéries pathogènes de l'homme à une faible concentration ( $\le 64\text{mg/L}$ ). Nous avons testé dans un premier temps la capacité inhibitrice d'extraits bruts de plants de tomate. Les feuilles dont sont issus les extraits bruts proviennent de tomates infestées ou non par *T. absoluta*, avec ou sans limitation de nutrition azotée. Les travaux de Victoire Coqueret (2013-2017) avaient montré que la limitation en azote seule augmente la teneur des feuilles en composés phénoliques, mais pas la teneur en phénolamides. En combinant la limitation d'azote à l'herbivorie, la teneur en phénolamides augmente (**Tableau 20**).

Aucun des extraits bruts, n'a montré une activité antibactérienne contre toutes les bactéries gram – et gram + testées. Par contre, les deux molécules pures kukA et CP ont présenté une faible activité antibactérienne. Cette faible activité des molécules pures, combinées à leur présence à de faibles concentrations dans les extraits bruts (20 $\mu$ g/g et 50 $\mu$ g/g de masse fraîche dans la modalité HN+T pour KukA et CP respectivement) explique le fait qu'aucune activité antibactérienne n'ait été détectée sur les extraits bruts.

Parmi les souches testées, celle de *Staphylococcus aureus* est la plus sensible aux deux phénolamides kukA et CP et notamment à kukA. *S. aureus* est une bactérie pathogène majeure de l'homme impliquée dans des maladies infectieuses sévères telles que l'endocardite, l'ostéomyélite, la bactériémie et la pneumonie mortelle (Lowy, 1998; Guo et al., 2020). Ces infections sont communes dans les hôpitaux (maladies nosocomiales), et certaines souches ont développées des résistances au principaux antibiotiques utilisés. Parmi ces souches récentes, il y a celles résistantes à la méthicilline (SARM) ou à la vancomycine (SARV) (Guo et al., 2020). Trouver un nouvel antibiotique efficace contre ces deux souches est d'une importance majeure. KukA et CP montrent des effets antibiotiques modérées sur *S. aureus* à des concentrations supérieures à 100 mg/L. Dans la littérature, l'effet antibactérien de kukA est identifié contre les souches SARM et SARV, à des concentrations < 99mg/L (Yingyongnarongkul et al., 2006, 2008). Dans nos travaux, nous n'avons pas testé l'activité antibactérienne de kukA sur ces deux souches. L'activité antibactérienne de CP n'a jamais été décrite. Dans la littérature, les concentrations modales des principaux antistaphylococciques pour les souches de *S. aureus* sensibles sont < à 16 mg/L (Daurel and Leclercq, 2008). Cela montre que les molécules testées ne présentent pas d'activité antibactérienne remarquable contre *S. aureus*. Il faudrait néanmoins évaluer l'effet que peuvent avoir ces molécules sur les souches SARM et SARV.

### **5.3. Les composés phénoliques de l'extrait brut présentent des effets anti-inflammatoires potentiels**

Les extraits bruts de feuilles de tomates élévés sous une nutrition azotée limitée présente une cytotoxicité. Cette cytotoxicité n'apparaît pas liée à l'acide chlorogénique puisqu'aux 3 concentrations testées avec cette molécule pure, la viabilité est proche de 100 %. Avec la concentration à 50  $\mu$ g/mL (correspondant à 15  $\mu$ g/mL d'acide chlorogénique) avec laquelle il n'y a pas de cytotoxicité, on observe un effet anti-inflammatoire quand le LPS est mis avant la fraction LN+T ou quand LN-T est mis avant le LPS. Cela signifie donc qu'un ou des composants présents dans ces deux fractions exerce(nt) un effet anti-inflammatoire. Ce ou ces composants ne se trouvent

pas dans HN-T ou dans HN+T, ou alors à de trop faibles concentrations pour exercer leur effet. Ce composant n'est pas l'acide chlorogénique puisqu'il n'a pas d'effet anti-inflammatoire lorsqu'il est utilisé seul aux concentrations correspondant à celles dans les extraits bruts. En plus, les fractions HN-T et HN+T en contiennent et elles n'ont pas d'effet anti-inflammatoire. La limitation de fertilisation azotée conduit à une augmentation des concentrations en composés phénoliques dans organes végétatifs de la tomate (Larbat et al., 2014; Royer et al., 2016). Ainsi, les fractions LN-T et LN+T contiennent plus de polyphénols que HN-T et HN+T. LN-T et LN+T contiennent aussi plus de flavonoïdes (comme la rutine), d'anthocyanines (comme les dérivés de pétunidine), et d'acide chlorogénique que HN-T et HN+T (Larbat et al., 2014). On peut donc supposer que la plus forte activité anti-inflammatoire des extraits LN-T et LN+T est liée à cette augmentation des concentrations en différents composés phénoliques.

Pour déterminer la concentration minimale d'extraits bruts LN-T et LN+T qui induisent un effet anti-inflammatoire, il faudra refaire des tests avec des concentrations plus faibles que 50 µg/mL d'extraits. Le fait que LN-T ajouté avant le LPS puisse enclencher un état anti-inflammatoire chez les macrophages THP-1 est très intéressant car cela peut être vu comme un rôle préventif anti-inflammatoire. LN-T constitue l'extrait qui contient le moins de phénolamides par rapport aux autres. L'effet constaté est certainement dû à d'autre(s) molécules présente(s) dans la fraction.

#### **5.4. CP présente des effets anti-inflammatoires potentiels décrits pour la première fois**

La CP a montré un léger effet anti-inflammatoire sans aucune cytotoxicité sur les macrophages à la concentration de 45 µM. Quand ces macrophages sont incubés avec le LPS puis qu'une heure après, on rajoute la CP à 30 ou à 45 µM, il y a une diminution dose-dépendante de la production de TNF-α. Cette molécule est donc capable de s'opposer à l'effet pro-inflammatoire engendré par le LPS. Les activités anti-inflammatoires de la CP ne sont pas décrites dans la littérature. Ainsi nos résultats sont prometteurs pour l'utilisation de la CP en prévention des inflammations. Les tests ont besoin d'être répétés.

Si cette molécule est ajoutée dans le milieu de culture des THP-1, 1h avant le LPS, il y a une diminution de la pro-inflammation déclenchée par le LPS (de 20%). Cela signifie donc que la molécule déclenche un processus anti-inflammatoire chez les THP-1 qui empêche le LPS de stimuler efficacement les cellules.

La kukA n'a montré aucun effet anti-inflammatoire sur les macrophages THP-1. Par contre l'effet anti-inflammatoire de cette molécule est bien décrit dans la littérature comme

neuroprotecteur (Hu et al., 2015, 2017; Roumani et al., 2020b). Les tests sont réalisés sur des cellules de moelle osseuses humaines (SH-SY5Y), ou des souris de laboratoire (C57BL/6) induit par MPP+ (1-méthyl-4-phényl pyridinium) ou MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine). Dans nos travaux nous avons réalisé les expériences sur des cellules de macrophages induites par LPS. Cela indique que la *kukA* ne présente pas un rôle anti-inflammatoire sur les macrophages. Dans ce cas il paraît intéressant de réaliser des tests sur des cellules de la moelle osseuse non utilisées en littérature, ou faire les tests sur des souris plutôt que sur des macrophages.

En conclusion, nos travaux ont montré la difficulté d'obtenir le phénolamide TDHC spermine à partir de la biomasse et également à partir de la synthèse chimique. Ainsi, la synthèse dans des systèmes hétérologues présente une alternative intéressante pour relever les défis de purification et de rendement de cette molécule, une fois l'enzyme de synthèse caractérisée. L'obtention prochaine de petites quantités de cette molécule nous permet d'envisager très prochainement de premiers tests anti-inflammatoires, antibactériens et anti-cancéreux. La CP disponible en synthèse chimique a montré des effets anti-inflammatoires jamais décrits. Il reste à définir la concentration minimale nécessaire pour avoir des effets anti-inflammatoires. La *kukA* n'a montré aucun effet anti-inflammatoire sur les macrophages. Des tests anti-cancéreux seront réalisés sur ces deux molécules.

## **Chapitre 5 : Discussions générales et perspectives**

Les métabolites spécialisés sont des molécules organiques présent en faibles concentrations chez les plantes. Elles accomplissent des fonctions essentielles pour la survie des plantes et représentent aussi des molécules marqueurs de la qualité des produits consommés (aspect visuel, contribution aux qualités organoleptiques des produits consommés) ainsi que des structures à forte valeur thérapeutique. Connaître ce métabolisme nous fournit des moyens d'améliorer notre façon de produire dans un contexte de changement climatique globale, en ayant moins recours à l'usage de pesticide de synthèse par exemple, et nous permet aussi d'améliorer la qualité nutritionnelle de l'alimentation.

Les phénolamides représentent une famille des métabolites spécialisés présents dans un grand nombre de plantes sauvages et cultivées. On les retrouve beaucoup dans les organes reproducteurs, mais également dans les tissus végétatifs où leur accumulation peut être induite par différentes contraintes biotiques et abiotiques. Ils présentent aussi des fonctions biologiques importantes (anti-inflammatoires, anti-oxydants, antibactériens, anticancéreux). Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont porté sur l'étude de la voie de biosynthèse des phénolamides chez la tomate au travers (i) la caractérisation de gènes impliqués dans le contrôle de leur biosynthèse, (ii) le développement d'outils méthodologiques destinés à étudier leur fonction *in vivo* et (iii) l'évaluation de leurs propriétés biologiques. Pour réaliser ce travail j'ai développé une approche pluridisciplinaire impliquant de la biologie moléculaire pour la caractérisation des gènes, de l'ingénierie métabolique, de l'écophysiologie et de la biochimie pour étudier les fonctions des gènes, et de la pharmacologie pour évaluer les effets thérapeutiques.

## **1. Compréhension de la voie de biosynthèse des phénolamides du plant de tomate**

### **1.1. Solyc06g083900.2, un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la voie des phénolamides ?**

Un premier objectif des travaux de thèse, était d'identifier des gènes impliqués dans le contrôle de la voie de biosynthèse des phénolamides. Nous avons identifié 2 facteurs de transcription, solyc06g083900.2 et solyc08g076930.1, orthologues de ceux de *N. attenuata* (*NaMYB8* et *NaMYC2*), et qui sont fortement induits par l'herbivorie de *T. absoluta*. Notre hypothèse était que, suite au stress herbivorie, le gène solyc08g076930.1 induit l'expression du gène solyc06g083900.2 qui à son tour entraîne l'accumulation de phénolamides *via* une induction des acyltransférases spécifiques dont *SIPHT1* et *SIPHT2*. La publication récente de Li et al. (2021) confirme une partie de notre hypothèse de départ, à savoir que solyc06g083900.2 est contrôlé par solyc08g076930.1, montrant ainsi une conservation des mécanismes de régulation entre tabac et

tomate. En revanche, nous n'avons pas d'élément assez solide pour valider ou invalider l'implication de solyc06g083900.2 dans le contrôle de la voie des phénolamides. La surexpression transitoire du gène solyc06g083900.2, dans les tomates n'a pas engendré une accumulation plus importante de phénolamides dans les tissus, cependant, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, l'absence d'accumulation de ces métabolites pourrait aussi être liée à plusieurs facteurs dont la disponibilité en substrat dans la plante. Dans leur travaux, Li et al. (2021) ont montré que solyc06g083900.2 joue un rôle régulateur de l'accumulation de flavonoïdes chez la tomate. Tout comme les auteurs de cette étude qui se sont focalisés sur la voie des flavonoïdes, mon analyse lors des expérimentations en expression transitoire s'est focalisée sur la voie des phénolamides. Une analyse plus globale des conséquences de l'expression de ce gène sur le métabolisme devra être conduite. Par ailleurs, que ce soit dans le cas des expressions transitoires ou de la caractérisation préliminaire des premiers transformants T1, je n'ai pas constaté d'effet de la surexpression de solyc06g083900.2 sur le niveau d'expression de *SlPHT1* et *SlPHT2* dont on suppose qu'ils contrôlent l'accumulation de CP *in vivo* en réponse à un stress herbivorie. L'analyse métabolique des feuilles et tiges de ces plantes T1 permettra de confirmer l'implication de ce gène dans la régulation de la voie des phénolamides.

## **1.2.Existe-t-il d'autres gènes candidats d'une nouvelle spermine transférase chez la tomate ?**

En plus des deux facteurs de transcription, nous avons cherché à identifier les gènes de synthèse du phénolamide le plus accumulé dans les tomates en réponse à l'herbivorie de *T. absoluta*, la N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. Savoir comment est synthétisé ce phénolamide est important (i) sur le plan de l'étude spécifique de l'interaction tomate/ *T. absoluta* car il nous permettrait de moduler spécifiquement l'accumulation de ce phénolamide est évaluer son rôle dans l'interaction et (ii) sur le plan de l'étude des fonctions biologiques de la N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine car il permettrait de disposer d'un moyen de synthèse simple de cette molécule.

Nous avons identifié 8 candidats fortement induits par l'herbivorie, parmi lesquelles 7 ont été testé. Pour le moment, les tests d'activités enzymatique n'ont pas permis d'identifier d'activité spermine transférase parmi ces candidats. Mais un certain nombre de contrôles restent encore à faire pour s'assurer de la bonne expression d'au moins 4 enzymes par notre système d'expression hétérologue. Deux candidats, solyc12g096770.1.1 (SHT7) et solyc12g010980.1.1 (SHT8) présentent une très forte identité avec une spermine transférase d'aubergine et plusieurs autres candidats proches des spermidine transférases de *N. attenuata* (NaDH29 et CV86). Les tests

d'activité ont été conduits avec de la spermine et de la spermidine en considérant qu'une enzyme pouvait réaliser les 3 acylations nécessaires à la synthèse de N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. Cette hypothèse n'est peut-être pas la bonne et il est possible qu'il s'agisse d'une réaction séquentielle impliquant plusieurs transférases reconnaissant chacune un intermédiaire de synthèse comme substrats. Des tests d'activités avec un intermédiaire monoacylés par exemple, pourrait peut-être permettre de montrer l'implication d'un des candidats dans la biosynthèse de la molécule cible. Par ailleurs, le criblage métabolique pourrait aussi être étendu à d'autres amines, comme l'agmatine ou la tyramine. Enfin, comme discuté dans le chapitre 2, l'hypothèse d'une autre famille enzymatique (polycétide synthase, GDSL) impliquée dans cette voie n'est pas à exclure et devra être prospectée.

## 2. Création des lignées de tomate transgéniques par régénération *in vitro*

J'ai développé et optimisé le protocole de régénération des plantes de tomate à partir des cotylédons pour les deux variétés *Ailsa craig* et *WVa106*. Ce travail a pris beaucoup de temps, mais j'ai réussi à obtenir des plantes T0 et T1 transgéniques.

Le choix de travailler sur deux variétés se justifiait par la possibilité d'optimiser les chances de succès de la mise en place de ce protocole. Effectivement les deux variétés se sont comportées différemment. *Ailsa craig* a demandé plus du temps pour former des tiges feuillées à partir des cals et a nécessité un travail conséquent de mise au point des conditions du milieu de culture. A ce stade, et en voyant que *WVa106* posait moins de problèmes, j'aurai certainement dû arrêter le travail sur *Ailsa craig* ce qui m'aurait permis d'avoir plus de temps pour d'autres aspects de ma thèse. Les résultats de régénération et de transformation (surexpression et CRISPR) sont très satisfaisants sur la variété *WVa106*. Mes résultats montrent une très grande efficacité de l'édition génétique par CRISPR Cas9, puisque la majorité des plantes régénérées avaient au moins 3 allèles différents mutés du gène ciblé. A partir des plantes transgéniques T0, nous avons obtenu des graines et des plantules T1, mais les problèmes de lumière dans les phytotrons ont été un autre point limitant pour la progression de ce travail, car il a fallu beaucoup de temps pour obtenir des fruits à partir des plantes T0. Dans un premier temps j'ai validé la transmissibilité des constructions de surexpression de T0 vers T1 et j'ai aussi vérifié la présence de la protéine Cas9 dans les T1. Les conditions de lumière actuelles sont aussi un frein pour la bonne réalisation des analyses métaboliques sur la génération T1 et les suivantes. La résolution prochaine de ce problème permettra d'accélérer la caractérisation des plantes transformées.

### **3.L'analyse des tomates transformées permettra de mieux comprendre les mécanismes de défense contre *T. absoluta***

L'obtention de lignées de tomate transgéniques affectées pour l'accumulation de phénolamides, constitue une étape importante du projet inter-unité « Biotactique ». Ce projet a pour double objectif de mieux caractériser l'efficacité des réponses métaboliques de la tomate vis à vis de *T. absoluta* et caractériser l'impact de pratiques culturales (pilotage de la nutrition azotée de la plante) sur le contrôle de ce ravageur.

En plus de la caractérisation métabolique et physiologique qui seront conduites au LAE, les plantes générées durant ma thèse seront caractérisées, par les partenaires du projet (ISA Sophia-Antipolis) pour leur résistance/sensibilité à *T. absoluta*. Les conséquences d'une augmentation d'accumulation en phénolamides dans les plants de tomate sur les traits de vie d'auxiliaires de culture (*Bracon nigricans*, *Macrolophus pygmaeus*) utilisés en contrôle biologique sur *T. absoluta* seront aussi évaluée, tout comme les capacités de détoxification des phénolamides par les larves du ravageur. Au-delà de l'étude spécifique de ces plantes, la compétence technique en édition de gène que j'ai apporté permettra de cibler d'autres voies métaboliques qui pourraient jouer un rôle dans l'interaction tomate/*T. absoluta* (composés organiques volatiles, inhibiteurs de protéase).

### **4.Criblage des activités thérapeutiques des phénolamides du plant tomate : à la recherche de nouvelles molécules bioactives**

La dernière partie de ma thèse a porté sur l'évaluation de propriétés biologique des phénolamides de tomate induits par l'herbivorie. Dans cette étude, l'herbivorie est vue comme un moyen d'augmenter la concentration et la diversité de métabolites pouvant avoir un intérêt thérapeutique. Parmi les métabolites induits, la N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine apparaît comme celle ayant le plus de potentiel de par sa proximité structurale avec la kukoamine A dont le potentiel thérapeutique a été largement étudié (Hadjiapavlou-Litina et al., 2009; Hu et al., 2017; Abe et al., 2017). Ce travail s'appuyait sur le projet collaboratif Antidote qui impliquait deux laboratoires de pharmacie, ce qui m'a permis de développer des approches de pharmacologie.

Comme nous l'avons vu, l'obtention de N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine en quantité et en pureté convenable pour la conduite de test biologiques n'est pas simple. Malgré mon travail sur la partie purification à partir de la plante qui a permis d'identifier et de solutionner plusieurs points de blocage, cette stratégie d'obtention de la molécule pure est apparue trop fastidieuse pour un trop faible rendement. La synthèse chimique nous permettra d'obtenir cette molécule dans les prochaines semaines, mais là encore, ce travail a demandé beaucoup de temps et

l'expertise de chimistes expérimentés. Une autre possibilité demeure la caractérisation de(s) l'enzyme(s) impliquée(s) dans sa biosynthèse, qui permettrait d'envisager une production plus simple dans des systèmes bactériens. A l'heure actuelle, pour cette molécule nous ne pouvons pas aller plus loin, mais des tests de criblage d'activités antibactériennes, anti-inflammatoires et anticancéreux sont prévus une fois qu'elle sera disponible.

En parallèle nos partenaires ont réalisé des tests d'activité antibactériennes et anti-inflammatoire sur la CP et la kukoamine A, toutes les deux disponibles dans le commerce. Les activités antibactériennes ont révélé, pour les deux molécules, une activité modérée contre *S. aureus*. C'est une première pour la CP et cela nécessitera de répéter les expériences avec des souches de cette bactérie qui présentent actuellement une menace à cause de leur résistance à plusieurs antibiotiques. La CP a également montré des activités anti-inflammatoires intéressantes qui demanderont plus d'investigation pour déterminer la concentration minimale suffisante pour déclencher un effet anti-inflammatoire significatif. C'est également un résultat original. La kukoamine n'a pas montré d'effets anti-inflammatoires sur les cellules macrophages. Mais par contre son effet est décrit dans la littérature comme un important agent neuroprotecteur des inflammations neuronales. Cet effet anti-inflammatoire différencié entre types cellulaires est un résultat intéressant qui pourrait être creusé afin de déterminer les mécanismes moléculaires qui sont mis en jeu.

## Références

- Abbes, K. and Chermiti, B.** (2014). Propensity of three tunisian populations of the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) for Deuterotokous Parthenogenetic Reproduction. *afen* **22**: 538–544.
- Abdeeva, I., Abdeev, R., Bruskin, S., and Piruzian, E.** (2012). Transgenic plants as a tool for plant functional genomics. *Transgenic Plants - Advances and Limitations*. DOI : 10.5772/33895.
- Abe, K. and Ichikawa, H.** (2016). Gene overexpression ressources in cereals for functional genomics and discovery of useful genes. *Front Plant Sci* **7**: 1359.
- Abe, K., Matsuura, H., Ukai, M., Shimura, H., Koshino, H., and Suzuki, T.** (2017). N-1, N-14-diferuloylspermine as an antioxidative phytochemical contained in leaves of *Cardamine fauriei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**: 1855–1860.
- Adhikari, P., Oh, Y., and Panthee, D.R.** (2017). Current status of early blight resistance in tomato: an update. *Int J Mol Sci* **18**.
- Alamgir, K.M., Hojo, Y., Christeller, J.T., Fukumoto, K., Isshiki, R., Shinya, T., Baldwin, I.T., and Galis, I.** (2016). Systematic analysis of rice (*Oryza sativa*) metabolic responses to herbivory. *Plant, Cell & Environment* **39**: 453–466.
- Alexiou, G.A., Lazari, D., Markopoulos, G., Vartholomatos, E., Hodaj, E., Galani, V., and Kyritsis, A.P.** (2017). Moschamine inhibits proliferation of glioblastoma cells via cell cycle arrest and apoptosis. *Tumor Biol.* **39**: 705744.
- Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V., Stöger, E., and Vasil, I.K.** (1996). Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum L.*) plants. *Plant Cell Reports* **16**: 12–17.
- Aly, S.M. and Sabri, D.M.** (2015). Next generation sequencing (NGS): a golden tool in forensic toolkit. *Arch Med Sadowej Kryminol* **65**: 260–271.
- Ament, K., Kant, M.R., Sabelis, M.W., Haring, M.A., and Schuurink, R.C.** (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiol* **135**: 2025–2037.
- Andersson, A.F. and Banfield, J.F.** (2008). Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science* **320**: 1047–1050.
- Aniszewski, T.** (2015). Chapter 2 - Alkaloid chemistry. In *Alkaloids* (Second Edition), ed (Elsevier: Boston), pp. 99–193.
- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M., and Teraoka, T.** (2007). Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology* **24**: 135–147.
- Ariizumi, T. and Toriyama, K.** (2011). Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 437–460.
- Arnó, J., Gabarra, R., Molina, P., Godfrey, K.E., and Zalom, F.G.** (2019). *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) success on common solanaceous species from California tomato production areas. *Environ. Entomol.* **48**: 1394–1400.
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M.-T., Monties, B., Fritig, B., and Legrand, M.** (1995). Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *The Plant Journal* **8**: 465–477.
- Austin, M. and Noel, J.** (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* **20**: 79–110.
- de Azevedo, S.M., Ventura Faria, M., Maluf, W.R., Barneche de Oliveira, A.C., and de Freitas, J.A.** (2003). Zingiberene-mediated resistance to the South American tomato pinworm derived from *Lycopersicon hirsutum* var. *hirsutum*. *Euphytica* **134**: 347–351.
- Bai, Z.-T., Wu, Z.-R., Xi, L.-L., Li, X., Chen, P., Wang, F.-Q., Meng, W.-B., Zhou, W.-C., Wu, X.-A., Yao, X.-J., and Zhang, M.** (2017). Inhibition of invasion by N-trans-feruloyloctopamine via AKT, p38MAPK and EMT related signals in hepatocellular carcinoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **27**: 989–993.
- Baker, C.J., Whitaker, B.D., Roberts, D.P., Mock, N.M., Rice, C.P., Deahl, K.L., and Aver'yanov, A.A.** (2005). Induction of redox sensitive extracellular phenolics during plant–bacterial interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **66**: 90–98.
- Barg, R., Pilowsky, M., Shabtai, S., Carmi, N., Szechtmann, A.D., Dedicova, B., and Salts, Y.** (1997). The TYLCV-tolerant tomato line MP-1 is characterized by superior transformation competence. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1919–1923.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P.** (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709–1712.

- Bassard, J.-E., Ullmann, P., Bernier, F., and Werck-Reichhart, D.** (2010). Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* **71**: 1808–1824.
- Bateman, R.M., Crane, P.R., DiMichele, W.A., Kenrick, P.R., Rowe, N.P., Speck, T., and Stein, W.E.** (1998). Early evolution of land plants: phylogeny, physiology, and ecology of the primary terrestrial radiation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 263–292.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N.J., and Nekrasov, V.** (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr. Opin. Biotechnol.* **32**: 76–84.
- Bendahmane, A., Querci, M., Kanyuka, K., and Baulcombe, D.C.** (2000). Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: application to the Rx2 locus in potato. *Plant J* **21**: 73–81.
- Benfey, P.N., Ren, L., and Chua, N.H.** (1990). Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *EMBO J* **9**: 1685–1696.
- Bentley, R. and Haslam, E.** (1990). The Shikimate Pathway — A Metabolic Tree with Many Branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **25**: 307–384.
- Bhaya, D., Davison, M., and Barrangou, R.** (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* **45**: 273–297.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K., and Carroll, D.** (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* **300**: 764–764.
- Biondi, A., Guedes, R.N.C., Wan, F.-H., and Desneux, N.** (2018). Ecology, worldwide spread, and management of the invasive south american tomato pinworm, *Tuta absoluta*: past, present, and future. *Annu. Rev. Entomol.* **63**: 239–258.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M.J., Francis, D., Causse, M., van der Knaap, E., and Cañizares, J.** (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* **16**: 257.
- Bleeker, P.M., Mirabella, R., Diergaard, P.J., VanDoorn, A., Tissier, A., Kant, M.R., Prins, M., Vos, M. de, Haring, M.A., and Schuurink, R.C.** (2012). Improved herbivore resistance in cultivated tomato with the sesquiterpene biosynthetic pathway from a wild relative. *PNAS* **109**: 20124–20129.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., and Bonas, U.** (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science* **326**: 1509–1512.
- Bolger, A., Lohse, M., Usadel, B.** (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120.
- Borejsza-Wysocki, W. and Hrazdina, G.** (1996). Aromatic polyketide synthases (purification, characterization, and antibody development to benzalacetone synthase from raspberry fruits). *Plant Physiol* **110**: 791–799.
- Böttger, A., Vothknecht, U., Bolle, C., and Wolf, A.** (2018). Plant secondary metabolites and their general function in plants. in lessons on caffeine, cannabis & co: plant-derived drugs and their interaction with human receptors, learning materials in biosciences. (Springer International Publishing: Cham), pp. 3–17.
- Bouayad Alam, S., Dib, M.E.A., Djabou, N., Tabti, B., Gaouar Benyelles, N., Costa, J., and Muselli, A.** (2017). Essential oils as biocides for the control of fungal infections and devastating pest (*Tuta absoluta*) of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Chem Biodivers* **14**.
- Bovy, A., Schijlen, E., and Hall, R.D.** (2007). Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. *Metabolomics* **3**: 399.
- Bozorov, T.A., Pandey, S.P., Dinh, S.T., Kim, S.-G., Heinrich, M., Gase, K., and Baldwin, I.T.** (2012). DICER-like proteins and their role in plant-herbivore interactions in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**: 189–206.
- Breinbauer, R., Vetter, I.R., and Waldmann, H.** (2002). Von proteindomänen zu wirkstoffkandidaten – naturstoffe als leitstrukturen für das design und die synthese von substanzbibliotheken. *Angewandte Chemie* **114**: 3002–3015.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z.B., and Van Eck, J.** (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol.* **166**: 1292–1297.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L.** (2015). Biochemistry and molecular biology of plants, 2nd Edition | Wiley. Wiley.com.
- Cabanne, F., Dalebroux, M.A., Martin-Tanguy, J., Martin, C.** (1981). Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* var. xanthi n.c. *Physiologia Plantarum* **53**: 399–404.
- Campolo, O. et al.** (2017). Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. *Sci Rep* **7**: 13036.

- Campos, L., Lisón, P., López-Gresa, M.P., Rodrigo, I., Zácarés, L., Conejero, V., and Bellés, J.M.** (2014). Transgenic tomato plants overexpressing tyramine n-hydroxycinnamoyltransferase exhibit elevated hydroxycinnamic acid amide levels and enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *MPMI* **27**: 1159–1169.
- Canto, T.** (2016). Transient expression systems in plants: potentialities and constraints. in advanced technologies for protein complex production and characterization, M.C. Vega, ed, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (Springer International Publishing: Cham), pp. 287–301.
- Caparros Megido, R., Haubruege, E., and Verheggen, F.J.** (2012). First evidence of deuterotokous parthenogenesis in the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Pest Sci* **85**: 409–412.
- Capecchi, M.R.** (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288–1292.
- Cardoza, R.E., Malmierca, M.G., and Gutiérrez, S.** (2014). Overexpression of erg1 gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413: effect on the induction of tomato defence-related genes. *J Appl Microbiol* **117**: 812–823.
- Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., Baller, J.A., Somia, N.V., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F.** (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* **39**: e82.
- Chatzivasileiou, A.O., Ward, V., Edgar, S.M., and Stephanopoulos, G.** (2019). Two-step pathway for isoprenoid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**: 506–511.
- Chen, H., Jones, A.D., and Howe, G.A.** (2006). Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters* **580**: 2540–2546.
- Chen, H.-C., Li, Q., Shuford, C.M., Liu, J., Muddiman, D.C., Sederoff, R.R., and Chiang, V.L.** (2011). Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 21253–21258.
- Chen, Y., Paetz, C., and Schneider, B.** (2018). Precursor-directed biosynthesis of phenylbenzoisoquinolindione alkaloids and the discovery of a phenylphenalenone-based plant defense mechanism. *J Nat Prod* **81**: 879–884.
- Cho, M., Jiang, W., and Lemaux, P.** (1998). Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism.
- Choi, S.W., Lee, S.K., Kim, E.O., Oh, J.H., Yoon, K.S., Parris, N., Hicks, K.B., and Moreau, R.A.** (2007). Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 3920–3925.
- Chung, S.-M., Frankman, E.L., and Tzfira, T.** (2005). A versatile vector system for multiple gene expression in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 357–361.
- Ciardi, J.A., Tieman, D.M., Lund, S.T., Jones, J.B., Stall, R.E., and Klee, H.J.** (2000). Response to *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiol* **123**: 81–92.
- Cocco, A., Deliperi, S., Lentini, A., Mannu, R., and Delrio, G.** (2015). Seasonal phenology of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in protected and open-field crops under mediterranean climatic conditions. *Phytoparasitica* **43**: 713–724.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., and Zhang, F.** (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819–823.
- Cooper, W.C., Jia, L., and Goggin, F.L.** (2004). Acquired and R-gene-mediated resistance against the potato aphid in tomato. *J Chem Ecol* **30**: 2527–2542.
- Coppola, M., Cascone, P., Bossi, S., Corrado, G., Garonna, A.P., Maffei, M., Rao, R., and Guerrieri, E.** (2018). TPS genes silencing alters constitutive indirect and direct defense in tomato. *Int J Mol Sci* **19**.
- Coqueret, V., Le Bot, J., Larbat, R., Desneux, N., Robin, C., and Adamowicz, S.** (2017). Nitrogen nutrition of tomato plant alters leafminer dietary intake dynamics. *J Insect Physiol* **99**: 130–138.
- Cuthbertson, A.G.S., Mathers, J.J., Blackburn, L.F., Korycinska, A., Luo, W., Jacobson, R.J., and Northing, P.** (2013). Population development of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under simulated UK glasshouse conditions. *Insects* **4**: 185–197.
- D'Ambrosio, C., Stigliani, A.L., and Giorio, G.** (2018a). CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato. *Transgenic Res* **27**: 367–378.
- Daurel, C. and Leclercq, R.** (2008). L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue Francophone des Laboratoires* **2008**: 81–90.
- David Hoffmann** (2003). Medical herbalism: the science and practice of herbal medicine.
- Delporte, M., Bernard, G., Legrand, G., Hielscher, B., Lanoue, A., Molinié, R., Rambaud, C., Mathiron, D., Besseau, S., Linka, N., Hilbert, J.-L., and Gagneul, D.** (2018). A BAHD neofunctionalization promotes tetrahydroxycinnamoyl spermine accumulation in the pollen coats of the Asteraceae family. *J Exp Bot*.

- Demkura, P.V., Abdala, G., Baldwin, I.T., and Ballare, C.L.** (2010). Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiol.* **152**: 1084–1095.
- Deng, Y. and Lu, S.** (2017). Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **36**: 257–290.
- Desneux, N. et al.** (2010). Biological invasion of european tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J Pest Sci* **83**: 197–215.
- Desneux, N., Luna, M.G., Guillemaud, T., and Urbaneja, A.** (2011). The invasive south american tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J Pest Sci* **84**: 403–408.
- Dias, D.M., Resende, J.T.V., Faria, M.V., Camargo, L.K.P., Chagas, R.R., and Lima, I.P.** (2013). Selection of processing tomato genotypes with high acyl sugar content that are resistant to the tomato pinworm. *Genet. Mol. Res.* **12**: 381–389.
- Díaz, J., ten Have, A., and van Kan, J.A.L.** (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **129**: 1341–1351.
- Dibyendu, D.M.** (2015). A brief review on plant type iii polyketide synthases, an important group of enzyme of secondary metabolism. *Research Journal of Recent Sciences* **4**: 138–147.
- Ding, X., Wang, X., Li, Q., Yu, L., Song, Q., Gai, J., and Yang, S.** (2019). Metabolomics studies on cytoplasmic male sterility during flower bud development in soybean. *Int J Mol Sci* **20**.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L.** (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085–1097.
- Dobritzsch, M., Lübken, T., Eschen-Lippold, L., Gorzolka, K., Blum, E., Matern, A., Marillonnet, S., Böttcher, C., Dräger, B., and Rosahl, S.** (2016). MATE transporter-dependent export of hydroxycinnamic acid amides. *The Plant Cell* **28**: 583–596.
- Donath, M.Y. and Shoelson, S.E.** (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* **11**: 98–107.
- Driesen, M., Hohn, T., and Fütterer, J.** (1993). Enhancement of a viral CaMV promoter by insertion of a BamHI linker. *Gene* **129**: 309–310.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L.** (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **15**: 573–581.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J.K., and Kaplan, I.** (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* **198**: 16–32.
- Duffey, S.S. and Stout, M.J.** (1996). Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **32**: 3–37.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C.S.** (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* **45**: 616–629.
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A., Aktaş, L., and Gesheva, E.** (2008). Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms.
- Edreva, A., Yordanov, I., Kardjieva, R., and Gesheva, E.** (1998). Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biologia Plantarum* **41**: 185–191.
- Edreva, A., Yordanov, I., Kardjieva, R., Hadjiiska, E., and Gesheva, E.** (1995). Expression of phenylamides in abiotic stress conditions. *Bulg. J. Plant Physiol.* 15–23.
- Edreva, A.M., Velikova, V.B., and Tsonev, T.D.** (2007). Phenylamides in plants. *Russ J Plant Physiol* **54**: 287–301.
- Elejalde-Palmett, C., Bernonville, D., Dugé, T., Glevarec, G., Pichon, O., Papon, N., Courdavault, V., St-Pierre, B., Giglioli-Guivarc'h, N., Lanoue, A., and Besseau, S.** (2015). Characterization of a spermidine hydroxycinnamoyltransferase in *Malus domestica* highlights the evolutionary conservation of trihydroxycinnamoyl spermidines in pollen coat of core Eudicotyledons. *J Exp Bot* **66**: 7271–7285.
- El-Sappah, A.H., M M, I., H El-Awady, H., Yan, S., Qi, S., Liu, J., Cheng, G.-T., and Liang, Y.** (2019). Tomato natural resistance genes in controlling the root-knot nematode. *Genes (Basel)* **10**.
- Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S.** (2009). Golden Gate Shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type IIIs restriction enzymes. *PLOS ONE* **4**: e5553.
- Essoung, F.R.E., Tadjong, A.T., Chhabra, S.C., Mohamed, S.A., and Hassanali, A.** (2020). Repellence and fumigant toxicity of essential oils of *Ocimum gratissimum* and *Ocimum kilimandscharicum* on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ Sci Pollut Res Int* **27**: 37963–37976.
- Eudes, A. et al.** (2016). Exploiting members of the BAHD acyltransferase family to synthesize multiple hydroxycinnamate and benzoate conjugates in yeast. *Microbial Cell Factories* **15**: 198.

- Eudes, A., Baidoo, E.E.K., Yang, F., Burd, H., Hadi, M.Z., Collins, F.W., Keasling, J.D., and Loqué, D.** (2011). Production of tranolast [N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl)-anthranilic acid] and its analogs in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**: 989–1000.
- Faegri, K. and Pijl, L.V.D.** (2013). Principles of pollination ecology (Elsevier).
- Fauser, F., SchimL, S., and Puchta, H.** (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **79**: 348–359.
- Fellenberg, C.** (2013). Biosynthesis and function of hydroxycinnamic acid amides in flowers of *Arabidopsis thaliana*.
- Fellenberg, C. and Vogt, T.** (2015). Evolutionarily conserved phenylpropanoid pattern on angiosperm pollen. *Trends in Plant Science* **20**: 212–218.
- Fellers, J.P., Guenzi, A.C., and Taliaferro, C.M.** (1995). Factors affecting the establishment and maintenance of embryogenic callus and suspension cultures of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Plant Cell Reports* **15**: 232–237.
- Feng, Z. et al.** (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science* **111**: 4632–4637.
- Finetti, F., Moglia, A., Schiavo, I., Donnini, S., Berta, G.N., Di Scipio, F., Perrelli, A., Fornelli, C., Trabalzini, L., and Retta, S.F.** (2018). Yeast-Derived Recombinant Avenanthramides Inhibit Proliferation, Migration and Epithelial Mesenchymal Transition of Colon Cancer Cells. *Nutrients* **10**: 1159.
- Friedman, M.** (2002). Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 5751–5780.
- Fu, D., Huang, B., Xiao, Y., Muthukrishnan, S., and Liang, G.H.** (2007). Overexpression of barley hva1 gene in creeping bentgrass for improving drought tolerance. *Plant Cell Rep* **26**: 467–477.
- Fu, R., Yang, P., Li, Z., Liu, W., Amin, S., and Li, Z.** (2019a). Avenanthramide A triggers potent ROS-mediated anti-tumor effects in colorectal cancer by directly targeting DDX3. *Cell Death Dis.* **10**: 593.
- Fu, R., Yang, P., Sajid, A., and Li, Z.** (2019b). Avenanthramide A induces cellular senescence via miR-129-3p/Pirh2/p53 signaling pathway to suppress colon cancer growth. *J. Agric. Food Chem.* **67**: 4808–4816.
- Funayama, S., Yoshida, K., Konno, C., and Hikino, H.** (1980). Structure of kukoamine A, a hypotensive principle of *Lycium chinense* root barks1. *Tetrahedron Letters* **21**: 1355–1356.
- Gális, I., Šimek, P., Narisawa, T., Sasaki, M., Horiguchi, T., Fukuda, H., and Matsuoka, K.** (2006). A novel R2R3 MYB transcription factor *NtMYBJS1* is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *The Plant Journal* **46**: 573–592.
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., Wu, Y., Zhao, P., and Xia, Q.** (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.* **87**: 99–110.
- Gaquerel, E., Gulati, J., and Baldwin, I.T.** (2014). Revealing insect herbivory-induced phenolamide metabolism: from single genes to metabolic network plasticity analysis. *Plant J* **79**: 679–692.
- Garcia, V. et al.** (2016). Rapid identification of causal mutations in tomato EMS populations via mapping-by-sequencing. *Nature Protocols* **11**: 2401–2418.
- García-Calderón, M., Pérez-Delgado, C.M., Palove-Balang, P., Betti, M., and Márquez, A.J.** (2020). Flavonoids and isoflavonoids biosynthesis in the model legume *Lotus japonicus*; connections to nitrogen metabolism and photorespiration. *Plants (Basel)* **9**.
- Garneau, J.E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A.H., and Moineau, S.** (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**: 67–71.
- Gates, D.J., Strickler, S.R., Mueller, L.A., Olson, B.J.S.C., and Smith, S.D.** (2016). Diversification of R2R3-MYB transcription factors in the tomato family solanaceae. *J Mol Evol* **83**: 26–37.
- Georgiev, L., Chochkova, M., Ivanova, G., Najdenski, H., Ninova, M., and Milkova, T.** (2012). Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines. *ResearchGate*.
- Gharekhani, G.H. and Salek-Ebrahimi, H.** (2014). Life table parameters of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) on different varieties of tomato. *J Econ Entomol* **107**: 1765–1770.
- Golawska, S., Sprawka, I., Lukasik, I., and Golawski, A.** (2014). Are naringenin and quercetin useful chemicals in pest-management strategies? *J Pest Sci* (2004) **87**: 173–180.
- Gontijo, P.C., Picanço, M.C., Pereira, E.J.G., Martins, J.C., Chediak, M., and Guedes, R.N.C.** (2013). Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Annals of Applied Biology* **162**: 50–59.
- Grienenerberger, E., Besseau, S., Geoffroy, P., Debayle, D., Heintz, D., Lapierre, C., Pollet, B., Heitz, T., and Legrand, M.** (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *The Plant Journal* **58**: 246–259.

- Griffiths, S., Mesarich, C.H., Overdijk, E.J.R., Saccomanno, B., de Wit, P.J.G.M., and Collemare, J.** (2018). Down-regulation of cladofulvin biosynthesis is required for biotrophic growth of *Cladosporium fulvum* on tomato. *Mol Plant Pathol* **19**: 369–380.
- Guedes, R.N.C. and Picanço, M.C.** (2012). The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *EPPO Bulletin* **42**: 211–216.
- Guo, D.-P., Sun, Y.-Z., and Chen, Z.-J.** (2003). Involvement of polyamines in cytoplasmic male sterility of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*). *Plant Growth Regulation* **41**: 33–40.
- Guo, W., Nie, L., Wu, D., Wise, M.L., Collins, F.W., Meydani, S.N., and Meydani, M.** (2010). Avenanthramides inhibit proliferation of human colon cancer cell lines in vitro. *Nutr Cancer* **62**: 1007–1016.
- Guo, X., Zhang, L., Wang, X., Zhang, M., Xi, Y., Wang, A., and Zhu, J.** (2019). Overexpression of *Saussurea involucrata* dehydrin gene SiDHN promotes cold and drought tolerance in transgenic tomato plants. *PLoS One* **14**: e0225090.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., and Wang, Y.** (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* **10**: 107.
- Guo, Z., Sun, X., and Xu, H.** (2018). Gateway-compatible inducible vector set for the functional analysis of transcription factors in plants. *Planta* **247**: 1261–1266.
- Gupta, M. et al.** (2012). Transcriptional activation of *Brassica napus*  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase II with an engineered zinc finger protein transcription factor. *Plant Biotechnology Journal* **10**: 783–791.
- Gupta, S. and Van Eck, J.** (2016). Modification of plant regeneration medium decreases the time for recovery of *Solanum lycopersicum* cultivar M82 stable transgenic lines. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **127**: 417–423.
- Hadacek, F.** (2002). Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 273–322.
- Hadjipavlou-Litina, D., Garnelis, T., Athanassopoulos, C.M., and Papaioannou, D.** (2009). Kukoamine A analogs with lipoxygenase inhibitory activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **24**: 1188–1193.
- Hagio, T., Hirabayashi, T., Machii, H., and Tomotsune, H.** (1995). Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare L.*) plant using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Reports* **14**: 329–334.
- Hain, R. and Grimmig, B.** (2000). Modification of plant secondary metabolism by genetic engineering. In metabolic engineering of plant secondary metabolism, R. Verpoorte and A.W. Alfermann, eds (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 217–231.
- Halitschke, R. and Baldwin, I.T.** (2003). Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* **36**: 794–807.
- Han, E.H., Kim, J.Y., Kim, H.G., Choi, J.H., Im, J.H., Woo, E.R., and Jeong, H.G.** (2010). Dihydro-N-caffeoyletyramine down-regulates cyclooxygenase-2 expression by inhibiting the activities of C/EBP and AP-1 transcription factors. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 579–586.
- Han, P., Bearez, P., Adamowicz, S., Lavoir, A.-V., Amiens-Desneux, E., and Desneux, N.** (2015). Nitrogen and water limitations in tomato plants trigger negative bottom-up effects on the omnivorous predator *Macrolophus pygmaeus*. *J Pest Sci* **88**: 685–691.
- Han, P., Wang, Z.-J., Lavoir, A.-V., Michel, T., Seassau, A., Zheng, W.-Y., Niu, C.-Y., and Desneux, N.** (2016). Increased water salinity applied to tomato plants accelerates the development of the leaf miner *Tuta absoluta* through bottom-up effects. *Sci Rep* **6**: 32403.
- Hartmann, T.** (1996). Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**: 177–188.
- Hastings, J. and Kenealey, J.** (2017). Avenanthramide-C reduces the viability of MDA-MB-231 breast cancer cells through an apoptotic mechanism. *Cancer Cell International* **17**: 93.
- Heath, M.C.** (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321–334.
- Hess, M.W.** (1993). Cell-wall development in freeze-fixed pollen: Intine formation of *Ledebouria socialis* (Hyacinthaceae). *Planta* **189**: 139–149.
- Hidalgo-Castellanos, J., Duque, A.S., Burgueño, A., Herrera-Cervera, J.A., Fevereiro, P., and López-Gómez, M.** (2019). Overexpression of the arginine decarboxylase gene promotes the symbiotic interaction *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* and induces the accumulation of proline and spermine in nodules under salt stress conditions. *J Plant Physiol* **241**: 153034.
- Hirsch, E.C. and Hunot, S.** (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet Neurology* **8**: 382–397.
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S., and Hoekema, A.** (1993). New agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* **2**: 208–218.

- Hoshikawa, K., Fujita, S., Renhu, N., Ezura, K., Yamamoto, T., Nonaka, S., Ezura, H., and Miura, K.** (2019). Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system. *Plant Cell Reports* **38**: 75–84.
- Hosseini, R.S., Madadi, H., Hosseini, M., Delshad, M., and Dashti, F.** (2015). Nitrogen in hydroponic growing medium of tomato affects the demographic parameters of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotrop Entomol* **44**: 643–650.
- Howe, G.A., Lee, G.I., Itoh, A., Li, L., and DeRocher, A.E.** (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol* **123**: 711–724.
- Hu, X., Song, Q., Li, X., Li, D., Zhang, Q., Meng, W., and Zhao, Q.** (2017). Neuroprotective effects of Kukoamine A on neurotoxin-induced Parkinson's model through apoptosis inhibition and autophagy enhancement. *Neuropharmacology* **117**: 352–363.
- Hu, X.-L., Gao, L.-Y., Niu, Y.-X., Tian, X., Wang, J., Meng, W.-H., Zhang, Q., Cui, C., Han, L., and Zhao, Q.-C.** (2015). Neuroprotection by Kukoamine A against oxidative stress may involve N-methyl-d-aspartate receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1850**: 287–298.
- Hussein, R.A. and El-Anssary, A.A.** (2018). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal Medicine*.
- Ilahy, R., Hdider, C., and Tlili, I.** (2009). Bioactive compounds and antioxidant activity of tomato high lycopene content advanced breeding lines. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology*: 6.
- Illa-Berenguer, E., Van Houten, J., Huang, Z., and van der Knaap, E.** (2015). Rapid and reliable identification of tomato fruit weight and locule number loci by QTL-seq. *Theor Appl Genet* **128**: 1329–1342.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A.** (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**: 5429–5433.
- Jagu, E., Pomet, S., Pethe, S., Loiseau, P.M., and Labruère, R.** (2017). Polyamine-based analogs and conjugates as antikinetoplastid agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **139**: 982–1015.
- Jahn, M., Paran, I., Hoffmann, K., Radwanski, E.R., Livingstone, K.D., Grube, R.C., Aftergoot, E., Lapidot, M., and Moyer, J.** (2000). Genetic mapping of the Tsw locus for resistance to the Tospovirus tomato spotted wilt virus in *Capsicum* spp. and its relationship to the Sw-5 gene for resistance to the same pathogen in tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 673–682.
- Jamann, T.M., Balint-Kurti, P.J., and Holland, J.B.** (2015). QTL mapping using high-throughput sequencing. *Methods Mol Biol* **1284**: 257–285.
- Jansen, R., Embden, J.D.A. van, Gaastra, W., and Schouls, L.M.** (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**: 1565–1575.
- Jeggo, P.A.** (1998). 5 DNA breakage and repair. In *Advances in Genetics*, J.C. Hall, J.C. Dunlap, T. Friedmann, and F. Giannelli, eds (Academic Press), pp. 185–218.
- Jia, H. and Wang, N.** (2014). Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLOS ONE* **9**: e93806.
- Jiang, W., Cho, M.-J., and Lemaux, P.G.** (1998). Improved callus quality and prolonged regenerability in model and recalcitrant barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Plant Biotechnology* **15**: 63–69.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., and Weeks, D.P.** (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* **41**: e188.
- Jinek, M. et al.** (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science* **343**: 1247997.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E.** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.
- Jones, J.B.** (1991). Compendium of tomato diseases (APS Press: St. Paul, Minn., USA).
- Jorgensen, J.H. and Turnidge, J.D.** (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1253–1273.
- Kage, U., Yogendra, K.N., and Kushalappa, A.C.** (2017). TaWRKY70 transcription factor in wheat QTL-2DL regulates downstream metabolite biosynthetic genes to resist *Fusarium graminearum* infection spread within spike. *Scientific Reports* **7**: 1–14.
- Kanayama, Y.** (2017). Sugar metabolism and fruit development in the tomato. *The Horticulture Journal* **advpub**.
- Kant, M.R., Ament, K., Sabelis, M.W., Haring, M.A., and Schuurink, R.C.** (2004). Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. *Plant Physiol* **135**: 483–495.
- Karban, R. and Myers, J.H.** (1989). Induced plant responses to herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematics* **20**: 331–348.

- Karban, R., Yang, L.H., and Edwards, K.F.** (2014). Volatile communication between plants that affects herbivory: a meta-analysis. *Ecol. Lett.* **17**: 44–52.
- Kaur, H., Heinzel, N., Schoettner, M., Baldwin, I.T., and Galis, I.** (2010). R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol.* **152**: 1731–1747.
- Khumsupan, P., Kozlowska, M.A., Orr, D.J., Andreou, A.I., Nakayama, N., Patron, N., Carmo-Silva, E., and McCormick, A.J.** (2020). Generating and characterizing single- and multigene mutants of the Rubisco small subunit family in arabidopsis. *J. Exp. Bot.*
- Kim, D., Alptekin, B., and Budak, H.** (2018). CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Funct. Integr. Genomics* **18**: 31–41.
- Kim, E.-O., Kwon, T.-K., and Choi, S.-W.** (2014). Diferuloylputrescine, a predominant phenolic amide in corn bran, potently induces apoptosis in human leukemia U937 cells. *J. Med. Food* **17**: 519–526.
- Kim, E.O., Min, K.J., Kwon, T.K., Um, B.H., Moreau, R.A., and Choi, S.W.** (2012). Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology* **50**: 1309–1316.
- Kim, Y.G., Cha, J., and Chandrasegaran, S.** (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 1156–1160.
- King, R.R. and Calhoun, L.A.** (2005). Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. *Phytochemistry* **66**: 2468–2473.
- Kirby, J. and Keasling, J.D.** (2009). Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 335–355.
- Kirchmaier, S., Lust, K., and Wittbrodt, J.** (2013). Golden gateway cloning – a combinatorial approach to generate fusion and recombination constructs. *PLoS One* **8**.
- Klapheck, S.** (1983). Polyamines and cinnamoyl-putrescines in normal and sulfur-starved suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **112**: 275–279.
- Komori, T., Imaiama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., and Komari, T.** (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiology* **145**: 1155–1160.
- Kong, D., Li, S., and Smolke, C.D.** (2020). Discovery of a previously unknown biosynthetic capacity of naringenin chalcone synthase by heterologous expression of a tomato gene cluster in yeast. *Science Advances* **6**: eabd1143.
- Königshofer, H. and Lechner, S.** (2002). Are polyamines involved in the synthesis of heat-shock proteins in cell suspension cultures of tobacco and alfalfa in response to high-temperature stress? | Request PDF. ResearchGate.
- Kotas, M.E. and Medzhitov, R.** (2015). Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell* **160**: 816–827.
- Krauss, S., Schnitzler, W.H., Grassmann, J., and Woitke, M.** (2006). The influence of different electrical conductivity values in a simplified recirculating soilless system on inner and outer fruit quality characteristics of tomato. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 441–448.
- Kumar, R., Kaur, A., Pandey, A., Mamrutha, H.M., and Singh, G.P.** (2019). CRISPR-based genome editing in wheat: a comprehensive review and future prospects. *Mol Biol Rep* **46**: 3557–3569.
- Kunin, V., Sorek, R., and Hugenholtz, P.** (2007). Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology* **8**: R61.
- Kurowska, M., Daszkowska-Golec, A., Gruszka, D., Marzec, M., Szurman, M., Szarejko, I., and Maluszynski, M.** (2011). TILLING: a shortcut in functional genomics. *J Appl Genet* **52**: 371–390.
- Kyselka, J., Bleha, R., Dragoun, M., Bialasová, K., Horáčková, Š., Schätz, M., Sluková, M., Filip, V., and Syntytsya, A.** (2018). Antifungal polyamides of hydroxycinnamic acids from sunflower bee pollen. *J. Agric. Food Chem.* **66**: 11018–11026.
- Lacerda, A.L.M., Fonseca, L.N., Blawid, R., Boiteux, L.S., Ribeiro, S.G., and Brasileiro, A.C.M.** (2015). Reference gene selection for qPCR analysis in tomato-bipartite begomovirus interaction and validation in additional tomato-virus pathosystems. *PLoS One* **10**: e0136820.
- Lamovšek, J., Stare, B.G., Pleško, I.M., Širca, S., and Urek, G.** (2017). Agrobacteria enhance plant defense against root-knot nematodes on tomato. *Phytopathology* **107**: 681–691.
- Langebartels, C., Kerner, K., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W., and Sandermann, H.** (1991). Biochemical-plant responses to ozone .1. differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* **95**: 882–889.
- Larbat, R., Paris, C., Le Bot, J., and Adamowicz, S.** (2014). Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Science* **224**: 62–73.

- Lazari, D., Alexiou, G.A., Markopoulos, G.S., Vartholomatos, E., Hodaj, E., Chousidis, I., Leonardos, I., Galani, V., and Kyritis, A.P.** (2017). N-(p-coumaroyl) serotonin inhibits glioblastoma cells growth through triggering S-phase arrest and apoptosis. *J. Neuro-Oncol.* **132**: 373–381.
- Leckie, B.M., Halitschke, R., De Jong, D.M., Smeda, J.R., Kessler, A., and Mutschler, M.A.** (2014). Quantitative trait loci regulating the fatty acid profile of acylsugars in tomato. *Mol Breeding* **34**: 1201–1213.
- Lecompte, F., Nicot, P.C., Ripoll, J., Abro, M.A., Rimbault, A.K., Lopez-Lauri, F., and Bertin, N.** (2017). Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. *Ann Bot* **119**: 931–943.
- Lee, C.-W., Efetova, M., Engelmann, J.C., Kramell, R., Wasternack, C., Ludwig-Müller, J., Hedrich, R., and Deeken, R.** (2009). *Agrobacterium tumefaciens* promotes tumor induction by modulating pathogen defense in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**: 2948–2962.
- Lee, D.G., Park, Y., Kim, M.-R., Jung, H.J., Seu, Y.B., Hahm, K.-S., and Woo, E.-R.** (2004). Anti-fungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*. *Biotechnology Letters* **26**: 1125–1130.
- Lee, H.I., León, J., and Raskin, I.** (1995). Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4076–4079.
- Lee, M.S., Albajes, R., and Eizaguirre, M.** (2014). Mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): polyandry increases reproductive output. *J Pest Sci* **87**: 429–439.
- Lee, Y.-R. et al.** (2011). Dihydroavenanthramide D inhibits human breast cancer cell invasion through suppression of MMP-9 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **405**: 552–557.
- Lee, Y.-T., Hsieh, Y.-L., Yeh, Y.-H., and Huang, C.-Y.** (2015). Synthesis of phenolic amides and evaluation of their antioxidant and anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *RSC Adv.* **5**: 85806–85815.
- Leonard, A.S. and Masek, P.** (2014). Multisensory integration of colors and scents: insights from bees and flowers. *J Comp Physiol A* **200**: 463–474.
- Li, C., Williams, M.M., Loh, Y.-T., Lee, G.I., and Howe, G.A.** (2002). Resistance of cultivated tomato to cell content-feeding herbivores is regulated by the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiol* **130**: 494–503.
- Li, H., Durbin, R.** (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. *Bioinformatics* **30**: 1754–60.
- Li, J., Yu, C., Wu, H., Luo, Z., Ouyang, B., Cui, L., Zhang, J., and Ye, Z.** (2015a). Knockdown of a JmjC domain-containing gene JMJ524 confers altered gibberellin responses by transcriptional regulation of GRAS protein lacking the DELLA domain genes in tomato. *J Exp Bot* **66**: 1413–1426.
- Li, J., Zhang, K., Meng, Y., Hu, J., Ding, M., Bian, J., Yan, M., Han, J., and Zhou, M.** (2018a). Jasmonic acid/ethylene signaling coordinates hydroxycinnamic acid amides biosynthesis through ORA59 transcription factor. *The Plant Journal* **95**: 444–457.
- Li, J.-F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M., and Sheen, J.** (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in arabidopsis and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotechnol.* **31**: 688–691.
- Li, J.-F., Zhang, D., and Sheen, J.** (2015b). Targeted plant genome editing via the CRISPR/Cas9 technology. *Methods Mol. Biol.* **1284**: 239–255.
- Li, M., Schneider, K., Kristensen, M., Borodina, I., and Nielsen, J.** (2016). Engineering yeast for high-level production of stilbenoid antioxidants. *Scientific Reports* **6**: 36827.
- Li, R., Fu, D., Zhu, B., Luo, Y., and Zhu, H.** (2018b). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of lncRNA1459 alters tomato fruit ripening. *The Plant Journal* **94**: 513–524.
- Li, Y., Wang, H., Zhang, Y., and Martin, C.** (2018c). Can the world's favorite fruit, tomato, provide an effective biosynthetic chassis for high-value metabolites? *Plant Cell Rep.* **37**: 1443–1450.
- Li, Y.-Y., Stewart, D.A., Ye, X.-M., Yin, L.-H., Pathmasiri, W.W., McRitchie, S.L., Fennell, T.R., Cheung, H.-Y., and Sumner, S.J.** (2019). A metabolomics approach to investigate kukoamine B—A potent natural product with anti-diabetic properties. *Front. Pharmacol.* **9**.
- Li, Y.-Y., Wang, H., Zhao, C., Huang, Y.-Q., Tang, X., and Cheung, H.-Y.** (2015c). Identification and characterization of kukoamine metabolites by multiple ion monitoring triggered enhanced product ion scan method with a triple-quadrupole linear ion trap mass spectrometer. *J. Agric. Food Chem.* **63**: 10785–10790.
- Li, Z., Peng, R., and Yao, Q.** (2021). SIMYB14 promotes flavonoids accumulation and confers higher tolerance to 2,4,6-trichlorophenol in tomato. *Plant Science* **303**: 110796.
- Li, Z., Zhao, C., Zhao, X., Xia, Y., Sun, X., Xie, W., Ye, Y., Lu, X., and Xu, G.** (2018d). Deep annotation of hydroxycinnamic acid amides in plants based on ultra-high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry and its *in silico* database. *Anal. Chem.* **90**: 14321–14330.

- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., and Gao, C.** (2014). Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics* **41**: 63–68.
- Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W.** (2014). FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **7**: 923–30
- Lichtenthaler, H.K., Rohmer, M., and Schwender, J.** (1997a). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum* **101**: 643–652.
- Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., and Rohmer, M.** (1997b). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett.* **400**: 271–274.
- Lin, T. et al.** (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat. Genet.* **46**: 1220–1226.
- Liu, Q., Luo, L., and Zheng, L.** (2018). Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *Int J Mol Sci* **19**.
- Liu, W., Xie, X., Ma, X., Li, J., Chen, J., and Liu, Y.-G.** (2015). DSDecode: a web-based tool for decoding of sequencing chromatograms for genotyping of targeted mutations. *Molecular Plant* **8**: 1431–1433.
- Liu, Y., Feng, X., Xu, Y., Yu, J., Ao, G., Peng, Z., and Zhao, Q.** (2009). Overexpression of millet ZIP-like gene (SiPf40) affects lateral bud outgrowth in tobacco and millet. *Plant Physiol Biochem* **47**: 1051–1060.
- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J* **31**: 777–786.
- Liu, Z., Alseekh, S., Brotman, Y., Zheng, Y., Fei, Z., Tieman, D.M., Giovannoni, J.J., Fernie, A.R., and Klee, H.J.** (2016). Identification of a *Solanum pennellii* Chromosome 4 Fruit Flavor and Nutritional Quality-Associated Metabolite QTL. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Lloyd, A.** (2003). Vector construction for gene overexpression as a tool to elucidate gene function. *Methods Mol. Biol.* **236**: 329–344.
- Long, Z., Zhang, Y., Guo, Z., Wang, L., Xue, X., Zhang, X., Wang, S., Wang, Z., Civelli, O., and Liang, X.** (2014). Amide alkaloids from *Scopolia tangutica*. *Planta Med* **80**: 1124–1130.
- Lopez-Gresa, M.P., Lison, P., Yenush, L., Conejero, V., Rodrigo, I., and Belles, J.M.** (2016). Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to citrus exocortis viroid and tomato spotted wilt virus. *PLoS One* **11**: e0166938.
- Lowry, B., Lee, D., and Hébant, C.** (1980). The origin of land plants: a new look at an old problem. *Taxon* **29**: 183–197.
- Lowy, F.D.** (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**: 520–532.
- Lu, H.T., Ouyang, W.M., and Huang, C.S.** (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Mol. Cancer Res.* **4**: 221–233.
- Luo, J., Fuell, C., Parr, A., Hill, L., Bailey, P., Elliott, K., Fairhurst, S.A., Martin, C., Michael, A.J.** (2009). A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in arabidopsis seed. *Plant Cell* **21**: 318–333.
- Ma, D. and Constabel, C.P.** (2019). MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants. *Trends Plant Sci* **24**: 275–289.
- Ma, X. et al.** (2015a). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant* **8**: 1274–1284.
- Ma, X., Chen, L., Zhu, Q., Chen, Y., and Liu, Y.-G.** (2015b). Rapid decoding of sequence-specific nuclease-induced heterozygous and biallelic mutations by direct sequencing of pcr products. *Molecular Plant* **8**: 1285–1287.
- Madhulatha Pantrangi, Ravindra Pandey, Pragati Hazarika, and Manchikatla Rajam** (2007). High transformation frequency in agrobacterium mediated genetic transformation of tomato by using polyamines and maltose in shoot regeneration medium. *Physiol Mol Biol Plants* **13**: 191–198.
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., van der Oost, J., and Koonin, E.V.** (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 467–477.
- Mao, Y., Botella, J.R., Liu, Y., and Zhu, J.-K.** (2019). Gene editing in plants: progress and challenges. *Natl Sci Rev* **6**: 421–437.
- Marti, G., Erb, M., Boccard, J., Glauser, G., Doyen, G.R., Villard, N., Robert, C.A.M., Turlings, T.C.J., Rudaz, S., and Wolfender, J.-L.** (2013). Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. *Plant Cell Environ.* **36**: 621–639.
- Martí, R., Roselló, S., and Cebolla-Cornejo, J.** (2016). Tomato as a source of carotenoids and polyphenols targeted to cancer prevention. *Cancers* **8**.
- Martínez de Alba, A.E., Elvira-Matelot, E., and Vaucheret, H.** (2013). Gene silencing in plants: a diversity of pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1829**: 1300–1308.

- Martins, J.C., Picanço, M.C., Bacci, L., Guedes, R.N.C., Santana, P.A., Ferreira, D.O., and Chediak, M.** (2016). Life table determination of thermal requirements of the tomato borer *Tuta absoluta*. *J Pest Sci* **89**: 897–908.
- Martin-Tanguy, J.** (1997). Conjugated polyamines and reproductive development: biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol, Plant.*: 675–688.
- Martin-Tanguy, J.** (1985). The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regulation* **3**: 381–399.
- Matsuda, F., Morino, K., Ano, R., Kuzawa, M., Wakasa, K., and Miyagawa, H.** (2005). Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue. *Plant Cell Physiol* **46**: 454–466.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., and Fraley, R.** (1986). Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* **5**: 81–84.
- Medzhitov, R.** (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**: 428–435.
- Mehaffey, E. and Majid, D.S.A.** (2017). Tumor necrosis factor- $\alpha$ , kidney function, and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* **313**: F1005–F1008.
- Meng, H. and Campbell, W.H.** (1997). Facile enzymic synthesis of caffeoyl CoA. *Phytochemistry* **44**: 605–608.
- Meurer, B., Wiermann, R., Strack, D.** (1988). Phenylpropanoid pattern in fagales pollen and their phylogenetic relevance. *Phytochemistry* **27**: 803–828.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H., and Qu, L.-J.** (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research* **23**: 1233–1236.
- Miękus, N., Marszałek, K., Podlacha, M., Iqbal, A., Puchalski, C., and Świergiel, A.H.** (2020). Health benefits of plant-derived sulfur compounds, glucosinolates, and organosulfur compounds. *Molecules* **25**: 3804.
- Mikkelsen, B.L., Olsen, C.E., and Lyngkjær, M.F.** (2015). Accumulation of secondary metabolites in healthy and diseased barley, grown under future climate levels of CO<sub>2</sub>, ozone and temperature. *Phytochemistry* **118**: 162–173.
- Mikkelsen, M., Naur P, and Halkier Ba** (2004). Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldioxime in auxin homeostasis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **37**.
- Minkenberg, B., Wheatley, M., and Yang, Y.** (2017). CRISPR/Cas9-enabled multiplex genome editing and its application. *Prog Mol Biol Transl Sci* **149**: 111–132.
- Mithöfer, A. and Boland, W.** (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 431–450.
- Mitsis, M., Alexiou, G.A., Vartholomatos, E., Markopoulos, G., Lazar, D., Hodaj, E., Nastos, D., Zagorianakou, P., Galani, V., and Kyritis, A.P.** (2018). N-(p-coumaroyl) serotonin induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells. *J. BUON* **23**: 129–133.
- Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D.C., Bischin, C., Hangani, D., Gheldiu, A.-M., Oprean, R., Silaghi-Dumitrescu, R., and Crișan, G.** (2014). Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Molecules* **19**: 10056–10073.
- Mohamadi, P., Razmjou, J., Naseri, B., and Hassanpour, M.** (2017). Population growth parameters of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) on tomato plant using organic substrate and biofertilizers. *J Insect Sci* **17**.
- Mohammadzadeh, S., Roohvand, F., Memarnejadian, A., Jafari, A., Ajdary, S., Salmanian, A.-H., and Ehsani, P.** (2016). Co-expression of hepatitis C virus polytope-HBsAg and p19-silencing suppressor protein in tobacco leaves. *Pharmaceutical Biology* **54**: 465–473.
- Morimoto, N., Ueno, K., Teraishi, M., Okumoto, Y., Mori, N., and Ishihara, A.** (2018). Induced phenylamide accumulation in response to pathogen infection and hormone treatment in rice (*Oryza sativa*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **82**: 407–416.
- Moriones, E., Praveen, S., and Chakraborty, S.** (2017). Tomato leaf curl new delhi virus: an emerging virus complex threatening vegetable and fiber crops. *Viruses* **9**.
- Muir, R.M., Ibáñez, A.M., Uratsu, S.L., Ingham, E.S., Leslie, C.A., McGranahan, G.H., Batra, N., Goyal, S., Joseph, J., Jemmis, E.D., and Dandekar, A.M.** (2011). Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*). *Plant Mol Biol* **75**: 555–565.
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., and Nishioka, T.** (2009). Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **230**: 517.
- Muroi, A., Matsui, K., Shimoda, T., Kihara, H., Ozawa, R., Ishihara, A., Nishihara, M., and Arimura, G.** (2012). Acquired immunity of transgenic torenia plants overexpressing agmatine coumaroyltransferase to pathogens and herbivore pests. *Scientific Reports* **2**: 689.

- Nagegowda, D.A.** (2010). Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Letters* **584**: 2965–2973.
- Naing, A.H. and Kim, C.K.** (2018). Roles of R2R3-MYB transcription factors in transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural plants. *Plant Mol Biol* **98**: 1–18.
- 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.
- Nazar, R.N., Xu, X., Shittu, H., Kurosky, A., and Robb, J.** (2018). Tomato Ve resistance locus; defense or growth. *Planta* **247**: 1339–1350.
- Ncube, B. and Van Staden, J.** (2015). Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. *Molecules* **20**: 12698–12731.
- Negrel, J. and Jeandet, P.** (1987). Metabolism of tyramine and feruloyltyramine in TMV inoculated leaves of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **26**: 2185–2190.
- Negrel, J., Pollet, B., and Lapierre, C.** (1996). Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. *Phytochemistry* **43**: 1195–1199.
- Ness, J.H.** (2003). Catalpa bignonioides alters extrafloral nectar production after herbivory and attracts ant bodyguards. *Oecologia* **134**: 210–218.
- Newman, M.A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J., and Dow, J.M.** (2001). Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by *hrp* gene-dependent and *hrp* gene-independent mechanisms. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 785–792.
- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., and Nureki, O.** (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**: 935–949.
- Novo, M., Silvar, C., Merino, F., Martinez-Cortes, T., Lu, F., Ralph, J., and Pomar, F.** (2017). Deciphering the role of the phenylpropanoid metabolism in the tolerance of *Capsicum annuum L.* to *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Sci.* **258**: 12–20.
- Odell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810–812.
- Okumura, A., Shimada, A., Yamasaki, S., Horino, T., Iwata, Y., Koizumi, N., Nishihara, M., and Mishiba, K.** (2016). CaMV-35S promoter sequence-specific DNA methylation in lettuce. *Plant Cell Rep* **35**: 43–51.
- Onkokesung, N., Gaquerel, E., Kotkar, H., Kaur, H., Baldwin, I.T., and Galis, I.** (2012). MYB8 controls inducible phenolamide levels by activating three novel hydroxycinnamoyl-coenzyme a:polyamine transferases in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* **158**: 389–407.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., and Bansal, Y.K.** (2015). Secondary metabolites of plants and their role: overview. *9*: 12.
- Page, P., Burrage, S., Baldock, L., and Bradley, M.** (1998). The synthesis of symmetrical spermine conjugates using solid-phase chemistry. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 1751–1756.
- Pandey, S.P. and Baldwin, I.T.** (2007). RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *The Plant Journal* **50**: 40–53.
- Park, J.B.** (2015). Bocatamide found in *Houttuynia cordata* suppresses p-selectin expression via inhibiting COX Enzyme, Not Increasing cAMP in Platelets. *Phytotherapy Research* **29**: 1381–1387.
- Park, J.B.** (2016). Bioavailability of Alfrutamide and Caffedymine and Their P-Selectin Suppression and Platelet - leukocyte aggregation mechanisms in mice. *J. Nutr.* **146**: 437S–443S.
- Park, J.B.** (2009). Isolation and characterization of n-feruloyltyramine as the p-selectin expression suppressor from garlic (*Allium sativum*). *J. Agric. Food Chem.* **57**: 8868–8872.
- Park, J.B.** (2012). Synthesis, biological activities and bioavailability of moschamine, a safflomide-type phenylpropenoic acid amide found in *Centaurea cyanus*. *Natural Product Research* **26**: 1465–1472.
- Park, J.B. and Schoene, N.** (2003). N-Caffeoyltyramine arrests growth of U937 and Jurkat cells by inhibiting protein tyrosine phosphorylation and inducing caspase-3. *Cancer Letters* **202**: 161–171.
- Park, S.H., Morris, J.L., Park, J.E., Hirschi, K.D., and Smith, R.H.** (2003). Efficient and genotype-independent agrobacterium-mediated tomato transformation. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1253–1257.
- Paschold, A., Halitschke, R., and Baldwin, I.T.** (2007). Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *The Plant Journal* **51**: 79–91.
- Patil, R.S., Davey, M.R., Power, J.B., and Cocking, E.** (2002). Effective protocol for agrobacterium-mediated leaf disc transformation in tomato (*Lycopersicon esculentum mill.*). *Indian Journal of Biotechnology* **1**: 339–343.

- Paudel, S., Lin, P.-A., Foolad, M.R., Ali, J.G., Rajotte, E.G., and Felton, G.W.** (2019). Induced plant defenses against herbivory in cultivated and wild tomato. *J. Chem. Ecol.* **45**: 693–707.
- Pearce, G., Marchand, P.A., Griswold, J., Lewis, N.G., and Ryan, C.A.** (1998). Accumulation of feruloyltyramine and p-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. *Phytochemistry* **47**: 659–664.
- Peng, H., Meyer, R.S., Yang, T., Whitaker, B.D., Trout, F., Shangguan, L., Huang, J., Litt, A., Little, D.P., Ke, H., and Jurick, W.M.** (2019). A novel hydroxycinnamoyl transferase for synthesis of hydroxycinnamoyl spermine conjugates in plants. *BMC Plant Biol* **19**: 261.
- Peng, H., Yang, T., Whitaker, B.D., Trout, F., Shangguan, L., Dong, W., and Jurick, W.M.** (2016). Characterization of spermidine hydroxycinnamoyl transferases from eggplant (*Solanum melongena L.*) and its wild relative *Solanum richardii* Dunal. *Hortic Res* **3**: 16062.
- Peralta, I.E., Spooner, D.M., and Knapp, S.** (2008). Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (solanum sect. lycopersicoides, sect. juglandifolia, sect. lycopersicon; solanaceae). *Systematic Botany Monographs* **84**:186.
- Perrin, J. et al.** (2021). Exploiting spermidine n-hydroxycinnamoyltransferase diversity and substrate promiscuity to produce various trihydroxycinnamoyl spermidines and analogues in engineered yeast. *ACS Synth. Biol.* **10**: 286–296.
- Petersen, M.** (2016). Hydroxycinnamoyltransferases in plant metabolism. *Phytochem. Rev.* **15**: 699–727.
- Peterson, B.A., Haak, D.C., Nishimura, M.T., Teixeira, P.J.P.L., James, S.R., Dangl, J.L., and Nimchuk, Z.L.** (2016). Genome-wide assessment of efficiency and specificity in CRISPR/Cas9 mediated multiple site targeting in arabidopsis. *PLoS ONE* **11**: e0162169.
- Piri, A., Sahebzadeh, N., Zibaei, A., Sendi, J.J., Shamakhi, L., and Shahriari, M.** (2020). Toxicity and physiological effects of ajwain (*Carum copticum*, Apiaceae) essential oil and its major constituents against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Chemosphere* **256**: 127103.
- Plana, D., Fuentes, A., Alvarez, M., Lara, R.M., Alvarez, F., and Pujol, M.** (2006). A new approach for *in vitro* regeneration of tomato plants devoid of exogenous plant growth hormones. *Biotechnol J* **1**: 1153–1157.
- Platten, M., Wild-Bode, C., Wick, W., Leitlein, J., Dichgans, J., and Weller, M.** (2001). N-[3,4-dimethoxycinnamoyl]-anthranilic acid (tranilast) inhibits transforming growth factor- $\beta$  release and reduces migration and invasiveness of human malignant glioma cells. *International Journal of Cancer* **93**: 53–61.
- Ponasik, J.A., Strickland, C., Faerman, C., Savvides, S., Karplus, P.A., and Ganem, B.** (1995). Kukoamine A and other hydrophobic acylpolyamines: potent and selective inhibitors of *Crithidia fasciculata* trypanothione reductase. *Biochemical Journal* **311**: 371–375.
- Pradhan, M., Pandey, P., Gase, K., Sharaff, M., Singh, R.K., Sethi, A., Baldwin, I.T., and Pandey, S.P.** (2017). Argonaute 8 (AGO8) Mediates the elicitation of direct defenses against herbivory. *Plant Physiology* **175**: 927–946.
- Prieto, J., Redondo, P., Padró, D., Arnould, S., Epinat, J.-C., Pâques, F., Blanco, F.J., and Montoya, G.** (2007). The C-terminal loop of the homing endonuclease I-CreI is essential for site recognition, DNA binding and cleavage. *Nucleic Acids Res* **35**: 3262–3271.
- Pryor, J.M., Potapov, V., Kucera, R.B., Bilotti, K., Cantor, E.J., and Lohman, G.J.S.** (2020). Enabling one-pot Golden Gate assemblies of unprecedented complexity using data-optimized assembly design. *PLoS One* **15**.
- Puchta, H., Dujon, B., and Hohn, B.** (1993). Homologous recombination in plant cells is enhanced by *in vivo* induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res* **21**: 5034–5040.
- Qian, D., Zhao, Y., Yang, G., and Huang, L.** (2017). Systematic review of chemical constituents in the *Genus Lycium* (Solanaceae). *Molecules* **22**: 911.
- Quesada-Ocampo, L.M. and Hausbeck, M.K.** (2010). Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology* **100**: 619–627.
- Quilichini, T.D., Grienberger, E., and Douglas, C.J.** (2015). The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry* **113**: 170–182.
- Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, F.J., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J.-P., and Lutts, S.** (2019). Tomato fruit development and metabolism. *Front Plant Sci* **10**: 1554.
- Raguso, R. and Weiss, M.R.** (2015). Concerted changes in floral colour and scent, and the importance of spatio-temporal variation in floral volatiles. *Journal of the Indian Institute of Science* **95**: 69–92.
- Raiola, A., Rigano, M., Calafiore, R., Frusciante, L., and Barone, A.** (2014). Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of inflammation*.
- Rayapuram, C. and Baldwin, I.T.** (2007). Increased SA in NPR1-silenced plants antagonizes JA and JA-dependent direct and indirect defenses in herbivore-attacked *Nicotiana attenuata* in nature. *Plant J.* **52**: 700–715.

- Razzaq, A., Saleem, F., Kanwal, M., Mustafa, G., Yousaf, S., Imran Arshad, H.M., Hameed, M.K., Khan, M.S., and Joyia, F.A.** (2019). Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox. *Int J Mol Sci* **20**.
- Reem, N.T. and Van Eck, J.** (2019). Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing in tomato. *Methods Mol Biol* **1917**: 171–182.
- Resende, J.T.V. de, Maluf, W.R., Faria, M.V., Pfann, A.Z., and Nascimento, I.R. do** (2006). Acylsugars in tomato leaflets confer resistance to the south american tomato pinworm, *Tuta absoluta* Meyr. *Scientia Agricola* **63**: 20–25.
- Rivas, S. and Thomas, C.M.** (2005). Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 395–436.
- Robinson, MD., McCarthy, DJ., Smyth, GK.** (2010) EdgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **1** :139-40
- Rocha, L., Monteiro, M., and Teodoro, A.** (2012). Anticancer properties of hydroxycinnamic acids -a review. *Cancer and Clinical Oncology* **1**: p109.
- Rodenburg, S.Y.A., Seidl, M.F., Judelson, H.S., Vu, A.L., Govers, F., and de Ridder, D.** (2019). Metabolic model of the *Phytophthora infestans*-tomato interaction reveals metabolic switches during host colonization. *mBio* **10**.
- Roepenack-Lahaye, E. von, Newman, M.-A., Schornack, S., Hammond-Kosack, K.E., Lahaye, T., Jones, J.D.G., Daniels, M.J., and Dow, J.M.** (2003). *P*-coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens. *J. Biol. Chem.* **278**: 43373–43383.
- Romero, F.M. and Gatica-Arias, A.** (2019). CRISPR/Cas9: Development and application in rice breeding. *Rice Science* **26**: 265–281.
- Röpenack, E. von, Parr, A., and Schulze-Lefert, P.** (1998). Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J. Biol. Chem.* **273**: 9013–9022.
- Rothan, C., Diouf, I., and Causse, M.** (2019). Trait discovery and editing in tomato. *Plant J.* **97**: 73–90.
- Rothstein, S.J., Lahners, K.N., Lotstein, R.J., Carozzi, N.B., Jayne, S.M., and Rice, D.A.** (1987). Promoter cassettes, antibiotic-resistance genes, and vectors for plant transformation. *Gene* **53**: 153–161.
- Roumani, M., Besseau, S., Gagneul, D., Robin, C., and Larbat, R.** (2020a). Phenolamides in plants: An update on their function, regulation, and origin of their biosynthetic enzymes. *Journal of Experimental Botany* **7**: 2334-2355.
- Roumani, M., Duval, R.E., Ropars, A., Risler, A., Robin, C., and Larbat, R.** (2020b). Phenolamides: Plant specialized metabolites with a wide range of promising pharmacological and health-promoting interests. *Biomed Pharmacother* **131**: 110762.
- Royer, M., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., Nicot, P.C., and Robin, C.** (2016). Tomato response traits to pathogenic pseudomonas species: does nitrogen limitation matter? *Plant Science* **244**: 57–67.
- Rudin, N., Sugarman, E., and Haber, J.E.** (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 519–534.
- Ruf, S. and Bock, R.** (2014). Plastid transformation in tomato. *Methods Mol Biol* **1132**: 265–276.
- Ryabinine, A.A. and Ilina, E.M.** (1949). Dokl. Akad. Nauk SSSR: 513.
- Salazar, E.R. and Araya, J.E.** (2001). Tomato moth, *Tuta absoluta* (Meyrick) response to insecticides in Arica, Chile.
- Samborski, D.J. and Rohringer, R.** (1970). Abnormal metabolites of wheat: occurrence, isolation and biogenesis of 2-hydroxypyputrescine amides. *Phytochemistry* **9**: 1939–1945.
- Sato, S. et al.** (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**: 635–641.
- Sawa, S.** (2002). Overexpression of the AtmybL2 gene represses trichome development in arabidopsis. *DNA Res* **9**: 31–34.
- Saxena, P., Hsieh, Y.-C., Alvarado, V.Y., Sainsbury, F., Saunders, K., Lomonossoff, G.P., and Scholthof, H.B.** (2011). Improved foreign gene expression in plants using a virus-encoded suppressor of RNA silencing modified to be developmentally harmLess. *Plant Biotechnology Journal* **9**: 703–712.
- Scarpa, E.S., Mari, M., Antonini, E., Palma, F., and Ninfali, P.** (2018). Natural and synthetic avenanthramides activate caspases 2, 8, 3 and downregulate hTERT, MDR1 and COX-2 genes in CaCo-2 and Hep3B cancer cells. *Food Funct.* **9**: 2913–2921.
- Schäfer, M., Meza-Canales, I.D., Brütting, C., Baldwin, I.T., and Meldau, S.** (2015). Cytokinin concentrations and Chase-domain containing HIS kinase 2 (NaCHK2)- and NaCHK3-mediated perception modulate herbivory-induced defense signaling and defenses in *Nicotiana attenuata*. *New Phytologist* **207**: 645–658.

- Schmidt, A., Scheel, D., and Strack, D.** (1998). Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* **205**: 51–55.
- Scofield, null, Tobias, null, Rathjen, null, Chang, null, Lavelle, null, Michelmore, null, and Staskawicz, null** (1996). Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**: 2063–2065.
- Seigler, D.S.** (1998). Plant secondary metabolism (Springer US).
- Sharma, E., Anand, G., and Kapoor, R.** (2017). Terpenoids in plant and arbuscular mycorrhiza-reinforced defence against herbivorous insects. *Ann Bot* **119**: 791–801.
- Sharma, M.K., Solanke, A.U., Jani, D., Singh, Y., and Sharma, A.K.** (2009). A simple and efficient agrobacterium-mediated procedure for transformation of tomato. *J Biosci* **34**: 423–433.
- Shevyakova, N.I., Rakitin, V.Yu., Stetsenko, L.A., Aronova, E.E., and Kuznetsov, V.V.** (2006). Oxidative stress and fluctuations of free and conjugated polyamines in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum L.* under NaCl salinity. *Plant Growth Regul* **50**: 69–78.
- Shikata, M. and Ezura, H.** (2016). Micro-tom tomato as an alternative plant model system: mutant collection and efficient transformation. *Methods Mol Biol* **1363**: 47–55.
- Shukla, V.K. et al.** (2009). Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* **459**: 437–441.
- Silva, G.A., Picanço, M.C., Bacci, L., Crespo, A.L.B., Rosado, J.F., and Guedes, R.N.C.** (2011). Control failure likelihood and spatial dependence of insecticide resistance in the tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *Pest Management Science* **67**: 913–920.
- Sim Sc, Robbins Md, Van Deynze A, Michel Ap, and Francis Dm** (2010). Population structure and genetic differentiation associated with breeding history and selection in tomato (*Solanum lycopersicum L.*). *Heredity (Edinb)* **106**: 927–935.
- Singh, B., Kumar, A., and Malik, A.K.** (2017). Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **38**: 820–832.
- Smith, J.E., Mengesha, B., Tang, H., Mengiste, T., and Bluhm, B.H.** (2014). Resistance to *Botrytis cinerea* in solanum lycopersicoides involves widespread transcriptional reprogramming. *BMC Genomics* **15**: 334.
- Sohrabi, F., Nooryazdan, H., Gharati, B., and Saeidi, Z.** (2016). Evaluation of ten tomato cultivars for resistance against tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) under field infestation conditions. *Entomologia Generalis*: 163–175.
- Song, G., Walworth, A., and Hancock, J.F.** (2012). Factors influencing agrobacterium-mediated transformation of switchgrass cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **108**: 445–453.
- Song, Y.H., Kim, D.W., Curtis-Long, M.J., Park, C., Son, M., Kim, J.Y., Yuk, H.J., Lee, K.W., and Park, K.H.** (2016). Cinnamic acid amides from *Tribulus terrestris* displaying uncompetitive  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *European Journal of Medicinal Chemistry* **114**: 201–208.
- Srinivas, C. et al.** (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity- A review. *Saudi J Biol Sci* **26**: 1315–1324.
- Stevens, R.** (1992). Dictionary of terpenoids. *Flavour and Fragrance Journal* **7**: 242–243.
- Stitz, M., Baldwin, I.T., and Gaquerel, E.** (2011). Diverting the flux of the JA pathway in *Nicotiana attenuata* Compromises the plant's defense metabolism and fitness in nature and glasshouse. *PLoS One* **6**: e25925.
- Stoessl, A. and Unwin, C.H.** (1970). The antifungal factors in barley. v. antifungal activity of the hordatines. *Can. J. Bot.* **48**: 465–470.
- Stout, M.J., Workman, J., and Duffey, S.S.** (1994). Differential induction of tomato foliar proteins by arthropod herbivores. *J Chem Ecol* **20**: 2575–2594.
- Subramaniam, V., Ace, O., Prud'homme, G.J., and Jothy, S.** (2011). Tranilast treatment decreases cell growth, migration and inhibits colony formation of human breast cancer cells. *Experimental and Molecular Pathology* **90**: 116–122.
- Sun, C., Höglund, A.-S., Olsson, H., Mangelsen, E., and Jansson, C.** (2005). Antisense oligodeoxynucleotide inhibition as a potent strategy in plant biology: identification of SUSIBA2 as a transcriptional activator in plant sugar signalling. *The Plant Journal* **44**: 128–138.
- Sun, H.-J., Uchii, S., Watanabe, S., and Ezura, H.** (2006). A highly efficient transformation protocol for micro-tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* **47**: 426–431.
- Suzaki, T., Tsuda, M., Ezura, H., Day, B., and Miura, K.** (2019). Agroinfiltration-based efficient transient protein expression in leguminous plants. *Plant Biotechnology (Tokyo, Japan)* **36**: 119–123.
- Takabayashi, J. and Dicke, M.** (1996). Plant—carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science* **1**: 109–113.

- Tanabe, K., Hojo, Y., Shinya, T., and Galis, I.** (2016). Molecular evidence for biochemical diversification of phenolamide biosynthesis in rice plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **58**: 903–913.
- Taube, A., Schlich, R., Sell, H., Eckardt, K., and Eckel, J.** (2012). Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **302**: H2148–H2165.
- Tebayashi, S., Horibata, Y., Mikagi, E., Kashiwagi, T., Mekuria, D.B., Dekebo, A., Ishihara, A., and Kim, C.-S.** (2007). Induction of resistance against the leafminer, *Liriomyza trifolii*, by jasmonic acid in sweet pepper. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1521–1526.
- Terns, M.P. and Terns, R.M.** (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 321–327.
- 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.
- Tholl, D.** (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **148**: 63–106.
- Tholl, D.** (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 297–304.
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., and Pichersky, E.** (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *arabidopsis* flowers. *The Plant Journal* **42**: 757–771.
- Till, B.J., Datta, S., and Jankowicz-Cieslak, J.** (2018). TILLING: the next generation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **164**: 139–160.
- Timilsina, S., Minsavage, G.V., Preston, J., Newberry, E.A., Paret, M.L., Goss, E.M., Jones, J.B., and Vallad, G.E.** (2018). *Pseudomonas floridensis* sp. nov., a bacterial pathogen isolated from tomato. *Int J Syst Evol Microbiol* **68**: 64–70.
- Tohge, T. and Fernie, A.R.** (2015). Metabolomics-inspired insight into developmental, environmental and genetic aspects of tomato fruit chemical composition and quality. *Plant Cell Physiol* **56**: 1681–1696.
- Torrigiani, P., Rabiti, A.L., Bortolotti, C., Betti, L., Marani, F., Canova, A., and Bagni, N.** (1997). Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist* **135**: 467–473.
- Trinchieri, G.** (2012). Cancer and Inflammation: An old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu. Rev. Immunol.* **30**: 677–706.
- Trujillo-Moya, C., Gisbert, C., Vilanova, S., and Nuez, F.** (2011). Localization of QTLs for *in vitro* plant regeneration in tomato. *BMC Plant Biol* **11**: 140.
- Tsai, S.-C. and Ames, B.D.** (2009). Structural enzymology of polyketide synthases. *Methods Enzymol* **459**: 17–47.
- Ube, N., Harada, D., Katsuyama, Y., Osaki-Oka, K., Tonooka, T., Ueno, K., Taketa, S., and Ishihara, A.** (2019). Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry* **167**: UNSP 112098.
- Ube, N., Nishizaka, M., Ichiyangi, T., Ueno, K., Taketa, S., and Ishihara, A.** (2017). Evolutionary changes in defensive specialized metabolism in the genus *hordeum*. *Phytochemistry* **141**: 1–10.
- Uchoa-Fernandes, M.A., Lucia, T.M.C.D., and Vilela, E.F.** (1995). Mating, oviposition and pupation of *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyr.) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* **24**: 159–164.
- Van Eck, J.** (2018). Genome editing and plant transformation of solanaceous food crops. *Curr. Opin. Biotechnol.* **49**: 35–41.
- Van Eck, J., Keen, P., and Tjahjadi, M.** (2019). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of tomato. *Methods Mol Biol* **1864**: 225–234.
- Van Eck, J., Kirk, D.D., and Walmsley, A.M.** (2006). Tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Methods Mol. Biol.* **343**: 459–473.
- Vargas-Ortiz, E., Gonda, I., Smeda, J.R., Mutschler, M.A., Giovannoni, J.J., and Jander, G.** (2018). Genetic mapping identifies loci that influence tomato resistance against Colorado potato beetles. *Sci Rep* **8**: 7429.
- Velásquez, A.C., Chakravarthy, S., and Martin, G.B.** (2009). Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J Vis Exp*.
- Verpoorte, R.** (2000). Secondary metabolism. in metabolic engineering of plant secondary metabolism. eds (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 1–29.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., and Memelink, J.** (2000). General Strategies. In *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. eds (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 31–50.
- Vetting, MW., S de Carvalho, LP., Yu, M., Hegde, SS., Magnet, S., Roderick, SL., Blanchard, JS.** (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* **433**: 212-26.

- Viuda-Martos, M., Sanchez-Zapata, E., Sayas-Barberá, E., Sendra, E., Pérez-Álvarez, J.A., and Fernández-López, J.** (2014). Tomato and tomato byproducts. human health benefits of lycopene and its application to meat products: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**: 1032–1049.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* **3**: 2–20.
- Vogt, T.** (2018). Unusual spermine-conjugated hydroxycinnamic acids on pollen: function and evolutionary advantage. *Journal of Experimental Botany* **69**: 5311–5315.
- Voytas, D.F.** (2013). Plant genome engineering with sequence-specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 327–350.
- Walling, L.L.** (2000). The myriad plant responses to herbivores. *J Plant Growth Regul* **19**: 195–216.
- Wang, L., Wang, P., Wang, D., Tao, M., Xu, W., and Olatunji, O.J.** (2020). Anti-inflammatory activities of kukoamine a from the root bark of *Lycium chinense* Miller. *Natural Product Communications* **15**: 1934578X20912088.
- Wang, Q., Li, H., Sun, Z., Dong, L., Gao, L., Liu, C., and Wang, X.** (2016). Kukoamine A inhibits human glioblastoma cell growth and migration through apoptosis induction and epithelial-mesenchymal transition attenuation. *Scientific Reports* **6**: 36543.
- Wang, Y., Chen, S., and Yu, O.** (2011). Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**: 949–956.
- Wang, Z., Zhao, Q., Li, L., Hu, P., Dong, K., Chen, S., and Jiang, J.** (2017). Development and validation of a rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for quantification of kukoamine B in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* **132**: 1–6.
- Waterman, P.G.** (2007). Roles for secondary metabolites in plants. In *Ciba Foundation Symposium 171 - Secondary Metabolites: their Function and Evolution* (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 255–275.
- Watts, K.T., Lee, P.C., and Schmidt-Dannert, C.** (2004). Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Chembiochem* **5**: 500–507.
- Widhalm, J.R. and Dudareva, N.** (2015). A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids. *Mol Plant* **8**: 83–97.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., and Doudna, J.A.** (2012a). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**: 331–338.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., and Doudna, J.A.** (2012b). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**: 331–338.
- Wiśniewska, N., Lipińska, M.M., Golębiowski, M., and Kowalkowska, A.K.** (2019). Labellum structure of *Bulbophyllum echinolabium* J.J. Sm. (section Lepidorhiza Schltr., Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae Juss.). *Protoplasma* **256**: 1185–1203.
- Woldemariam, M.G., Dinh, S.T., Oh, Y., Gaquerel, E., Baldwin, I.T., and Galis, I.** (2013). NaMYC2 transcription factor regulates a subset of plant defense responses in *Nicotiana attenuata*. *BMC Plant Biol.* **13**: 73.
- Wroblewski, T., Tomczak, A., and Michelmore, R.** (2005). Optimization of agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 259–273.
- Xie, L.-W., Atanasov, A.G., Guo, D.-A., Malainer, C., Zhang, J.-X., Zehl, M., Guan, S.-H., Heiss, E.H., Urban, E., Dirsch, V.M., and Kopp, B.** (2014). Activity-guided isolation of NF-κB inhibitors and PPAR $\gamma$  agonists from the root bark of *Lycium chinense* Miller. *Journal of Ethnopharmacology* **152**: 470–477.
- Xin, Z., Yu, Z., Erb, M., Turlings, T.C.J., Wang, B., Qi, J., Liu, S., and Lou, Y.** (2012). The broad-leaf herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid turns rice into a living trap for a major insect pest and a parasitic wasp. *New Phytol.* **194**: 498–510.
- Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., and Chen, Q.-J.** (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* **14**: 327.
- Yamamoto, T., Hoshikawa, K., Ezura, K., Okazawa, R., Fujita, S., Takaoka, M., Mason, H.S., Ezura, H., and Miura, K.** (2018). Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. *Scientific Reports* **8**: 4755.
- Yan, R., Wang, Z., Ren, Y., Li, H., Liu, N., and Sun, H.** (2019). Establishment of efficient genetic transformation systems and application of CRISPR/Cas9 genome editing technology in *Lilium pumilum* DC. Fisch. and *Lilium longiflorum* white heaven. *Int J Mol Sci* **20**.
- Yang, J., Sun, C., Zhang, Y., Fu, D., Zheng, X., and Yu, T.** (2017). Induced resistance in tomato fruit by  $\gamma$ -aminobutyric acid for the control of alternaria rot caused by *Alternaria alternata*. *Food Chem* **221**: 1014–1020.
- Yarou, B.B., Bawin, T., Boullis, A., Heukin, S., Lognay, G., Verheggen, F.J., and Francis, F.** (2018). Oviposition deterrent activity of basil plants and their essentials oils against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Environ Sci Pollut Res Int* **25**: 29880–29888.

- Yasmeen, A.** (2009). An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). *Acta Physiol Plant* **31**: 1271.
- Yeo, D., Kang, C., Zhang, T., and Ji, L.L.** (2019). Avenanthramides attenuate inflammation and atrophy in muscle cells. *Journal of Sport and Health Science* **8**: 189–195.
- Yi, Z., Wang, Z., Li, H., and Liu, M.** (2004). Inhibitory effect of tellimagrandin I on chemically induced differentiation of human leukemia K562 cells. *Toxicology Letters* **147**: 109–119.
- Yingyongnarongkul, B., Apiratikul, N., Aroonrerk, N., and Suksamrarn, A.** (2006). Solid-phase synthesis and antibacterial activity of hydroxycinnamic acid amides and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**: 5870–5873.
- Yingyongnarongkul, B., Apiratikul, N., Aroonrerk, N., and Suksamrarn, A.** (2008). Synthesis of bis, tris and tetra(dihydrocaffeoyl)polyamine conjugates as antibacterial agents against VRSA. *Arch. Pharm. Res.* **31**: 698–704.
- Yogendra, K.N., Kumar, A., Sarkar, K., Li, Y., Pushpa, D., Mosa, K.A., Duggavathi, R., and Kushalappa, A.C.** (2015). Transcription factor StWRKY1 regulates phenylpropanoid metabolites conferring late blight resistance in potato. *J Exp Bot* **66**: 7377–7389.
- Yogendra, K.N. and Kushalappa, A.C.** (2016). Integrated transcriptomics and metabolomics reveal induction of hierarchies of resistance genes in potato against late blight. *Functional Plant Biol.* **43**: 766–782.
- Yogendra, K.N., Sarkar, K., Kage, U., and Kushalappa, A.C.** (2017). Potato NAC43 and MYB8 mediated transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis to contain *Phytophthora infestans* infection. *Plant Mol Biol Rep* **35**: 519–533.
- Young, J. et al.** (2019). CRISPR-Cas9 editing in maize: systematic evaluation of Off-target activity and its relevance in crop improvement. *Scientific Reports* **9**: 6729.
- Yu, D. et al.** (2018). Development of a Gateway-compatible pCAMBIA binary vector for RNAi-mediated gene knockdown in plants. *Plasmid* **98**: 52–55.
- Zacarés, L., López-Gresa, M.P., Fayos, J., Primo, J., Bellés, J.M., and Conejero, V.** (2007). Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *MPMI* **20**: 1439–1448.
- Zappalà, L. et al.** (2013). Natural enemies of the south american moth, *Tuta absoluta*, in Europe, North Africa and Middle East, and their potential use in pest control strategies. *J Pest Sci* **86**: 635–647.
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N., and Zhu, J.-K.** (2014). The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol. J.* **12**: 797–807.
- Zhang, L., Rybczynski, J.J., Langenberg, W.G., Mitra, A., and French, R.** (2000). An efficient wheat transformation procedure: transformed calli with long-term morphogenic potential for plant regeneration. *Plant Cell Reports* **19**: 241–250.
- Zhang, P.-J., Zhao, C., Ye, Z.-H., and Yu, X.-P.** (2020a). Trade-off between defense priming by herbivore-induced plant volatiles and constitutive defense in tomato. *Pest Manag Sci* **76**: 1893–1901.
- Zhang, Y., Bouwmeester, H.J., and Kappers, I.F.** (2020b). Combined transcriptome and metabolome analysis identifies defence responses in spider mite-infested pepper (*Capsicum annuum*). *J. Exp. Bot.* **71**: 330–343.
- Zhao, P., Li, Q., Li, J., Wang, L., and Ren, Z.** (2014). Genome-wide identification and characterization of R2R3MYB family in *Solanum lycopersicum*. *Mol Genet Genomics* **289**: 1183–1207.
- Zhao, Q., Li, L., Wang, Z., Jiang, J., Dong, K., Chen, S., and Hu, P.** (2016). Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for determination of kukoamine B in human blood and urine. *Journal of Chromatography B* **1031**: 8–14.
- Zhong, R., Morrison, W.H., Negrel, J., and Ye, Z.-H.** (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *The Plant Cell* **10**: 2033–2045.
- Zhu, G. et al.** (2018). Rewiring of the fruit metabolome in tomato breeding. *Cell* **172**: 249–261.e12.
- Zuriaga, E., Blanca, J., and Nuez, F.** (2009). Classification and phylogenetic relationships in solanum section Lycopersicon based on AFLP and two nuclear gene sequences. *Genet Resour Crop Evol* **56**: 663–678.

# Annexes

## Annexe 1

### 1. Séquences ADNc des gènes ciblés

#### >Solyc08g083900, SIMYB13 :

TTATGCTATATCAGCTCCAAGTCCAAGTGAAAAATCAAAACAAAGTATAGAGAGAGAGAAAAAATAAA  
ATGGGGAGATCTCCTGCTGTGAGAAATTGGGGTTGAAAAGAGGTCATGGAGCAAAGAAGAAGATT  
ATTACTCATCAATTACATTAAAAGAATGGTCATCCTAATTGGCGTGCACCTCCAAAACCTGCAGGTC  
TATTAAGGTGCGGAAAAAGTTGAGGCTCGATGGACTAATTACTGAGACCTGATATTAAGCGAGGC  
AATTTACTCATCAAGAAGAAGATAATTCAAGTGATCAAGTTCTGGAAACAGTTGGTCTGCT  
ATTGCAGCAAGATTACCCGGAAGAACAGATAACGAAATAAAAACATTGGCATACTCGTCTGAAGAA  
AAAAAGGAATGAATCTCAACTTAAAGAAACCCAACTGGAGCCTGAAAATACTAATGTAGATGTACATT  
TGGAGGAGGCCAACATTCTAATGATAAACATTCCGAAATATCGAATCTTAAATAACATCGAAATC  
CAACAACAACCAAGTCCATCATCGTCAGTATCATCAAGTGAAGATTGATGTTCAAATACAACACTGC  
AACGAGTTAGTCAGAGTCAGAAATCAAATAATGTCCGATAATTGTTAGAAATTGATGACGATATTGGT  
CCGAGGTTAGTATGGGCACAAGTCGATGACAATTATGTTGATTGTCATTAATGGAGGATAATTACAC  
ATTAATTCTAGCTTGATGATAATTGGTTGGGATGATCTTTACAAGATCTAATGAGTTGATGTTAG  
AATTGCCTGAATTATGAGC

#### >SPHT1, Solyc11g071470 :

ATGAATGTGAAAATTGAGAGTTCAAAAATCATCAAGCCATTGTATGAAGGAATTCCACCTTCAACTAC  
AATTCAATTCCATTCAATGCTTTGACAATGTAACATTGATACTCTAATGGCTTGATTTATGCTTAT  
AGACCACCCACCCCTCCCACATCCACTATCGAAACGGGACTTCGAAAGACGTTATCGATTTATCGAGA  
GTGGGCGGGCGAATAGGTGAAGATGAACATGTAATCGAGGAGTTTCTCAATGATGAGGGTGTTC  
GATTCACTCGAGGCCTGTAGACGCCCTCGTGGACGAAGTATTGCCCTAAAGCCTCTCCCTATGC  
TCTCCTTACATCCTAGTTAAAGATGTTAGTGGAGTTAATCCAAGTCCAAGTCACACGTTACGTGTG  
GCTCTGTGGTGGTGGTTTACCGGCCACCACATGATAGCTGACGCCACGCTGCAAGCAACTTTTG  
TCGCGTGGGGCAAGCATGTCGAGGGATGGAATTACACCCATCCGATGAAACGATCGTGTATTTC  
CGCCCTCGAAATCCACCCCTAGTCGAGTACAACCATGTTGGGGCGAATTCTGTGTCAAATTAGTAAAC  
AAAGAGTTAGTCAAAATCAACAACGATCAAGATAAAGAGAAAAATATCATAGTCCACAAAGTCCATT  
CACCTGGAGTTCTAGGGAAACTCAAGGCACATGCCCTTTATGAATGGGAAAGGCCAAACTTATA  
GCACGTTCGAAAGTCTTATAGCCCATTGTGGAGGGTTATTACAAATTGCGTAACCTAAACGCGTCAC  
AGAACACCCAAATTGAATTCGGTCGATGGAAGGAGAAGATAAACACCTAGGTTCCGGATGAATT  
TTTGGTAACATGGTTATGGCATTCCAACATCAAAGTGAAGGACTTACTAGATGAGGCCACTTCAT  
TATGCAACAAAGATTACATGAGGAATTACTAAAGTTGATGACAATATTCAAGTCATTATTGAT  
TTGCAAATGATGAGAAAGTAATGACTAGACAAGATTAAACCAAGTGCACACATGAAGAATGATT  
ACTTTGTCCAAACTTGGAGTTGATAGTTGGTTGAGGTTCCATTATGACTGGATTGGTACTGGT  
TGCCCATTTTGTATGCCCTCTATTATCCAATAGAAGGGATGATGTTCTGTGCCATCATTATTG  
GAGATGGAAGCATTGATGCTTTATTCCATTATGAACACAATTAAACAAATTCAAGAAAATTGTT  
ACTCTCTAGATTGAAAGCAAAGTGA

#### >SPHT2, Solyc11g071480

ATGAATGTGAAAATTGATAGTTCAAAAATCATCAAGCCATTATATGAAGGAACTCCTCCTTCAACTACA  
ACTCATATTCCATTCAATATCTTGACAATGTAACATTGATGCTCTAATGGCTCTAATATATGCTTATA  
GACCACCCACCCCTCCCACATCCACTATTGAAATAGGACTTCGAAAGACGTTATCGATTTATCGAGAGT  
GGCAGGAAGAATAGGTGAAGATGAACATGTAATCGAGGAGTTTCTTAATGATGAGGGTGTGCA  
TTCATCGAGGCCTGTGGACACCTCATTGGATGAAGTATTGCCCTAAAGCCTCGCCCTGTGCTCT  
CCTGCACCTAGTTAAAGGATGTTAGTGGAGTTAATCCAAGTCCAAGTCACACGTTACGTGTGGCT  
CTGTGGTGGTGGTTACCGGCCACCACATAATAGCTGACGCCATGCTGCAAGCAACTTTTGTG  
CGTGGGTCAAGCGTGGCGAGGGATGGAATTACACCCCTCCGGTAATGACCGAAGTATTTCGCG  
CCTCGGGATCCACCCCTCGTCAAGTACAACCATGTTGGGGCGAATTGCTGTCACATTAGGATACAA  
GGAGTTAGTCAAAGTCAACAACGATGAACATAAAGAGAGAATATCATAGTCCACAAAGTCCATTCA  
CCTTGGAGTACCTAGGGAAACTCAAGGCGCATGCTTCTTTATGAATGAAATGCAAAACTTATAGC  
ACGTTGAAAGTCTAATAGCCCATTGAGGGTTATTACAAATCGCGTACTAAACCGCTTCAG  
AACACCCGAATTGAAATCGTCAAGTGGAGGAGAAGAATTACCTAGGGTCCGGATGAATT

TGGTAACATAGTGTATGGCATTCCAACATCAAAAGTGAAGGACTTACTAGATGAGCCACTCACTA  
TGCACAAAGATTATACATGAGGAATTAGTAAAGTGTGACAAATATTCAGTCATTATTGACTT  
TGCAAAATGATGAAAAAGTGTGACTAGACAAGATTAAATACCAAGTGCACAAACATGAACAATGAATC  
TTTGTCCAACCTGGAAAGTGTGATAGTGGTTGAGGTTCCATTATGACTTGGATTGGCACTGGTTG  
CCATTGTTATGCCTTATTATCCAATAGAAGGAATGATGTTCTGCCCCATTTATTGGA  
GATGGAAGCATTGATGCTTTATTCTTATATGAACACAATCTAACAAATTCAACAAATTGTTATT  
CTCTAGATTGAAAGCAAAGTGA

**>SPHT3, Solyc06g074710 :**

ATGAAGGTCAAAATAGAAAGTCAAAAATCATTAAGCCTTCTATGAAGACAACATCATCCCTCCCT  
ACTAAAACCTATATTCCCCTAGTGTCTTGATAAAGTCACCTATGAAGCCAAATTGCTATTATCTATG  
CCTATGCCCTCCACTCCACCAACGCCGATTCAATTGGGCTCAAAAGGCCCTAGCGATTACA  
GGGAGTGGCAGGGCATTAGTAAAGACGAAAATGGTATTCCAGTAATTGCTCAATGATGAAGGT  
GTTGATTGTTGAGGCATCAGCGATAGTACCCCTGATAAAGTTATGCCCTTAAACCTCCGCTTCTT  
TGCTTAACITACATCCTCGCTGAACAATGTGGTCAGTGGTCAAGTCAAGTCACAAGGTTCACTT  
GTGGCTCGTGGTGGTCGGGTTACCGCTCACCACACTGTGGCGGATGCCATTCCACTAGCAACTTT  
TAGTTGCATGGGTCAAGCCTGTCGAGGGCTTGACATTAATCCTCTCCTTACATGATGTCACATT  
TAACCCCTCGAAACCCCTCTTATCGAGTATGAGCATAAGGGGACCGAGTTATGTCACAAATCAGTAA  
AAAGGAAAATTCACTCGATGAAAGTACTCATGTCACCGAAGATATAGTGGTGCACAAAGTCCATT  
TCACCGTTGAGTTCTAGCAAAACTCAAAGTAAAAGCCTCTCAATGAAACAATAACAATAACAGTAA  
AGTAACAGACCTTATAGCACATTGAAAGCCTGTTGCACATTATGGAGGGCCATCACTAAAGCGCG  
AGGCCTAAGTGGCTCGAGACAACTCATATAAGAATCTCAGTAATGGTAGATGAGGTTGAACCCCA  
GAGTACCTAATGAGTACTTGGAAACTTAGTACTGTGGCATTCCAACATCAAAGTGAAGGATCTT  
TAAGAGAGCCTCTCCTTATGCAACAAAGCTATTGACGCGGGTGTAAAAGTAAACAATAACTATT  
TTAGATGTTCATAGACTTGTCAATCAAAGATGAGGATCTCATACCAACAGCAGATATGAAACAAA  
CACATATTATGCTTAATCTCGAAGTTGATAGTGGTTAAGGTTCCATTCTACGACTAGATTGGAA  
TGGGGTGTCCGTACATGTTCATGCCTCATATTCCCAACAGAAGGGATGATGTTCTTACCATCATT  
CATTGGAGATGGAAGCATTGATGCTTTATTCCATTGTTCAAGACAACCTGCCACCTCAAGAAAAT  
TTGCTATTCTTAGATGTCCTGA

**>SPHT4,**

**Solyc11g066640 :**ATGAAGATTAAAATAGAAAGTCAAGAATTATTAAGCCTTCTATGAACACACCCCTC  
CTTCTACACAAAGCCACATTCCCTCTTAGTGTGTTTGATAAGGTACATATGAGGCTCAAATTGCTATCAT  
ATATGCCTACCACCCACCCACCCACCAAATATCGCGATTGAATTAGGTCTCGAAAAGCCTAGTTGT  
TTATCGAGAGTGGGTGGAAGATTAGGTGAAGATGAACATGAAATCGAGTGTATTCTCCTCAATGATG  
AGGGTGTAGATTGTCGAGGCATCGCTAGTAGCACTCTAGATCAAGCAATGCCCTCAAGCCTCGC  
CTCTTGCCTAGCCTACATCTAGCTGAAGGATGTCAAAGAATTGGTCAAGTCAATTAACTAGGT  
TCACITGTGGCTCCTAGTGGTGGTTACCGCGACCACCGTAGCAGACGGTCATTCAACTAGCA  
ACTTCTGGTTGCATGGGCAAGCTGTCGAGGCCTCAAAGTCATCCTCTTGCATGATCGTA  
GTATTTCACCCACGAAATTCTCCTCTTCGAGTATCAACATAAAGGGTGAATATATGTCAGT  
CTAAAAAAAGAACATTCACTCAATGAAGTTCATCATATCTGAAGATGTTGTCACACAAAGTCAATT  
TCACAGTTCAATTCTCGCAAATCTAAAGCAAAGGCTCTCAATGAAATGAAATAACAAGCCTATA  
GCACCTTGAAAGTCTCCTGCCATTATGGAGAGTCATAACCAAAGCCCGGGCTAAGTGGATTG  
AGTCAACCCAAATAAGAATCTCAGTCAATGGTAGAACCAAGGTTGAACCCAAAAGTACCCAACGAGTAC  
TTGGCAACTTAGCCTATGGCATTCCAACACAAAGTGAAGAACTATTACGAGAACCTCTGCC  
ACACGCAACAAACTATTGACGCTATTGCAAAAGTAAACAACACTATTGAGTCATTATTGA  
CTTGCTAACACCAAAGCTAAAGAAGAAGATCTGCCCCACGCGGACATGAAACAAGTACATACTTT  
GCCAAATATCGAGGTGGATAGTGGTTAAGGTTCCATTCTACGACCTAGATTGGTACGGGTGCC  
CGTACATGTTCATGCCTCGTATTCTCCTACCGAAGGCATGATGTTCTTACCTCTTCGTGGAGA  
CGGAAGTATCGATGTCCTCGTCTTATTGAAAGACAAGTGGCACTCTCAAGAAAATTGTTATTCC  
TTGGACTTGCTTGAAGATTAA

**>Solyc08g076930.1.1 :**

ATGACTGAATACAGCTGCCACCATGAATTGGAACAATAGTACTAGCGATGATAACGTTCTATG  
ATGGAAGCTTTATGTCCTGATCTTCTTGGCTACTAATAATTCTACTTCTGCTGCTGTTGG  
TGTCAATTCAAATCTCCTCATGCTAGTAGTAATACTCCCTGTTGACCATCTTCTACATCTG  
CATCTACTTATCCGAGCTGCGACTGTGGATGCTCCAAATCTATGCCCTTCAACCAAGAAACCC  
TTCAGCAGCGTCTCAAGCTTATTGATGGTGTAGAGAGACGTGGACTTATGCTATTTGGCAAT  
CGTGGTTGTGATTCTCAAGTCCGTCGTGTTGGGAGATGGTATTACAAAGGGAGAAG  
ATAAAGCAAAAGGAAATTATCGGTGTCATCACCTGCTTATATTGCTGAGCAGGAGCATCGGAAGAAG

GTTCTACGGGAGCTGAATTCTGATTCCGGGCACCACCCGAACGGATGATCGGGTTGATGAAGA  
 AGTTACCGACACCGAATGGTCTTCTTATCTCCATGACCCAATCGTTGTTAATGGAAGTGGGCTTCCT  
 GGTCAAGCGGTGATAGTCCAGCCGATTGGGTCGCCGGAACTGAGAAATTGGCAGCTTCACACTGT  
 GAACGTGTGAGGCAAGCACAAGGGTCGGGCTTCAGACGATTGTCTGATTCTTCAGCTAACGGCGT  
 GGTGAATTGGGCTCGACGGAGTTGATTGTTCAAAGTCTGATCTTATGAACAAGGTTAGAGTATTGTT  
 TAACTTAGTAATGATTGGGTTCTGGGTCATGGGCTGTGCAGCCGGAGAGCGACCCATCGGCCTCTG  
 GCTCACTGATCCATCGCCTCAGGTATGGAAGTTAGAGAGTCTTAAATACAGTCAAACAAATTCACT  
 TCCATCTAGTAATAGTAATAAGCAAATTGCTTATGGAATGAGAATAATCATCCATCTGAAATGGTC  
 AGAGTTGTTACAATCAGCAACAACAGAAGAATCCTCCTCAGCAACAAACACAAGGATTCTCACGAGG  
 GAGTTGAATTTCGGAATTGGGTTCGATGGAAGTAGTAATAGGAATGGAATTTCATCGGTTCTG  
 AACGCTGAATCAGGAGAAATCTGAAATTGGGTTAGTAGTACTAAAAAAAGTCTCCAGTGCCAAATGT  
 GAACTGTTACAGGTCACTCCAAATTGGGCTGGGAGGAGAATAATAACAAGAACAGAAAAGA  
 TCAGCTACTCCAGGGGAAGCAATGAAGAAGGAATGCTTCATTGTTCAAGGTACAGTTGCCTCT  
 TCGGCATGAAGTCAGGTGGAGGCGGAGGCGAAGACTCTGAACATTCACTCGAGGCTTCAGTGGT  
 GAAAGAAGCTGATAGTAGTAGAGTGGTAGAGCCTGAAAAGAGGCCAAGGAAGCGAGGTAGAAAGCC  
 AGCGAATGGACGGGAGGAGGCCATTGAATCACGTCGAGGCAGAGAGGCAAAGGAGGGAGAATTGAA  
 CCAAAGATTCTACCGCCTAGAGCTGTTGACCAAAATGTTCTAAGATGGACAAGGCATCACTCCTGG  
 AGATGCTATTCTCTATATAACGAGTTGAAATCGAAGCTTCAAAATACAGAGTCAGATAAGAACACT  
 TGAAGAGCCAATAGAAGATTAAAGAAAGAATCAAGGCGCCCCGGCTCTCCACCAACAAATCAA  
 GATCTCAAGATGTCTAGCCACACTGGAGGCAAGATTGAGACGTGGATATAAGCTTAAGATCATCGG  
 ATGGGATGCAATGATTGTTACATGTAATAAAAAGAATCATCCAGCCAGGCTAATGGCAGCGC  
 TCATGGAATTAGACCTAGACGTGCATGCCAGTGTTCAGTTGTCACGATTGATGATCCAACAAAG  
 CCACAGTAAAATGGTAGCAGACATTACACTGAAGAGCAGCTAGGGTAGCAGTACATGAAACAAATT  
 GCTGAAACACACTAA

**>Solyc07g008390.1.1, SHT1 :**

ATGCTAAAACACCGCTTATGCAGTTCAATACACGTGTATGCAATTGACACGTGTCTGTTACTTCC  
 TATTGATGGAGTCCAAGGTTCTACAAAGATTCAAATCCTTCCAAAAGTATCATAAAATCAAATCAT  
 GATAATAATGTTGATCACCCAAAATTACAAATTATCCTTTTGTATCAATTGCTCTCCAAATGCATG  
 TCCCTGTGTTCTTTTATCCACTCAAAATCCACATTACTAAAACCTCTATTATACACGAACAATT  
 TCAACAATCATTGCTAAGCTTAAAGTCACTGTTATCCAGCGTCAGGTAGATTTCATCTGATGGCAA  
 TCTATCAATTGTCATGATGAAGGTGTTGATATAAAGGCAAAGTTGATTCTCAATTGTTGATTTC  
 TCAAGGATGCACAAAAGATATGACCTAGCATTGAATTGGCTAAAGTCGATCGAACGATTG  
 AATTGCTATGACACCACTAGTTGAGTGCAGTGCAGGGAGTTGCTGTGTAAGGGGCTAGCTTAA  
 TGTGTAAGCTCTGAACATGCCGTTATTGATGGATTCAAGCATTGAAATTGTTACGAGTGGCTAAA  
 GTGAGTAAAATGGGAAATTAAAGATCAATTGCTTCACTTTGATGATTGTTGACCATTTCACCA  
 ACAAGTGATAGTCATTGTTAAAAGAGTCGAGTCCTAGAGATGATCCTAATCATGATTTCCTGAA  
 ATGGTAGCAAGGAGGTTGTCATTAATCAATCAGTGATATCAAACCTAGGGAACATGTTGAGTGGT  
 TCATATCAGACCATCACGAGTTGAATTGGTGATTGCTTTCTATGGAGGGCTGATCAATGTTATCG  
 ATGAAAAGTAATGACGTTGAGACCTTGTATTGAGCGTCCCTGTAATTACGTTGAAAATTGAA  
 CTTCCAAGATACGAAAACCTCTGGAAATTGCTATTGAAGTCCCCTGAAATTCACTCCGGGAGA  
 AACAGGAATGGAGTTAAAAGACATTACTATTGATCAAGGACGTCATACAAAAAATCAACGTATCAT  
 TTGCGAAATCTAGTGTATGATATATTGCTAGCATCCAAGTTCAAAAGAAATACAAGAACGTT  
 GAAAATGAACAAGTGGATGTTGACATGGCATCAAGTTATGAGGTTCCCTATTATGAAGCTGATT  
 GGTTGGGGTAAACCTGTTGCTAAGTTGGATTGAGACGTAGTGTATGTTGGTTGATGATACA  
 CCATGTGGAGTGGAAATTATGTTCAAGTAGATTGAAAGAAAGACTACATGGACATGTTGGATGTGA  
 CAGAGATTATTGTCCTCACTTGTGAGTAG

**>Solyc02g093180.2.1, SHT2 :**

CTCACTAAATATAAGTGAATCCTCTCAGTTAGCTCTGCATCAAATTATATTATATATAGGT  
 ATGTGAGCCATGACTCATTAAGTATAAGTGAATTCTCCTCAGTTAGCTTGTCAACAAATATTCAA  
 GATGACAAAACCTCGAGTAGTATCAGTATGTTAATTAGGTCCAAAATTCTCTCAAGCAAAAAAA  
 TCCAGTTAACTCCATGGGATCTCAACTCCTCACAGTAGATCCTATCCAAAAGGATTATTTCCTGTA  
 AACCAAACTCTGAGCAACCTAAAGAGTTAGCAGAAATTATCATCAGAAATTATTAATGCCCTAAAGTT  
 TCACTCTGATACTCTAAATCATTTCTCTCGCGGGTCGACTTATTGCTAGTAAAAAATAGTGATG  
 GCACCTCATCTTCTTGTAGATTGCAACAATGAAGGAGGCTGAGTTCAATTACGTCACTGCACCTGATT  
 TAACTGTGGATGATATCTTGGAAACAAACTACGTGCCAAAGATTGTCAGTATTCTCCACTCAATG  
 GAGTATGCAACTATGAAGGTGTTCAAAACCATTGTTGGCTGTGCAAGTCACAGAGCTAGTGGATGGA  
 TTCTCATTGGGTGCACTATCAATCATTGTTGAGCGGATGGACTTCATTGGCATTTCTCAATTGTT

GGTCTGAAATAGCGCGAGTGGAGATTCCAATCTTATCGTAATAAACCGCCGGTCTGGACCGTTGGT  
 TTCTGAATTGTTGCTAGTCCAATTCAATGACCTTTATCTAATGAACATGTCCATGATGAATTGATCT  
 GCCTTGTAGAAGAAAGAGTTCCATTAGCAAGGAGAATATAGCTCAACTCAAAGCCAAGGCCA  
 ATTCTGAATATGGAAACGACCAAAAGAGTTGTATCTCTTCAATTACAAGCCGTTGGCTCATATCTGGC  
 AATCTGTATCCGTTGCCGTGTTGACGAAACGCTAACGAAAATTAGTTCAAAATTACTTATAGGCG  
 CAAGGACAAGGCTCAGCCGATTACCTGAAGGCTATTGGAATGCGGTACATTGTAAACGTG  
 ACAACCACCGCTAGGGAGATGTTGGACATGATTCAAGGTTGGCTATGAAATAAAAGGTGGT  
 ATCTACGCAAACATGAAGAGGTATGAATTTCATAAAATTGGGTAAAAATCCGAAGATCGTGA  
 AAAAGAGTGAAGTGGTGTCTAATAGCTGATTGCTAGCAGCTGCCGCTTCGATGTACGGCAAT  
 GATTTGGATGGGAAGACCGGTTGGGTGAGAAGTGGCGCTGGCAACAAACATGACGGAAATGA  
 CAATATTGTTGCGAAGAAGGAAGTATAGACATTGAAGCTGTTGACCCCTGAAACTTACATG  
 CCATGGGACAAGACACTAAATTCAATGGGGGACCTGTCAGTAAAAATTGAAATCGCTTAAGCTAATTAC  
 TTATTATGTTATGGATATGGTTAATTAAATAATGAACCTTATGTGAGTCGATTATCTTGGA  
 GATGACTTAGAGTTACCTACCACTGAGTCTGACTCAATAGTCAAATCCATTATCCATTCTCTTT  
 GTTATTATTAATAAAATATTGTGTGGTTGATTATCAATATTCTCCTCACATTCCACACACG  
 TGTTAATTGTC

**>Solyc05g015800.2.1, SHT3 :**

CATATTCAAAATAACAACCTCAATCAATCGTTGCTAGCACTCTAAATTCTATTAAACCGAATAAAAGTA  
 CGTTACACGTACGTATGGCACATAAAACTATGCCAATTTCAGTTACACATGACAAGCCAAATTAGTTG  
 TTCCATCAATTGTAACACCTCATGAGATAAAGCATCTTCTGAAATAGATGATCAAGGGAGTACTCGTT  
 TCCATGTTCTGTATTAAATGTTTATAAAATAATTCTTAATGGAAGGTAATGATCCAGCAAAATTAT  
 TAAAAATGGATTATCTAAACACTTGTTATTATCCATTAGCTGGTAGACTCATTGAAGGGCCTAA  
 TAAAAAGCTTATGGAAATTGCAATGGTGAAGGAGTCTGTTATTGAAGCTGATGCTAATGTGGAGCT  
 TGAAAAATTAGGTGACTCTATTAAACCACCATGTCATATGGATTACTACTTCACAATGTTCTGG  
 TTCTGATGGAATGATTGGTGCCTCTTGTCAATTCAAGGTGACTCGTTACTGTGGTGGATTGTT  
 ATTGGATTAGAGTAAATCACACAATGATGGATGCATATGGTATCAAATTGTTCTAAATGCATTAAGT  
 GAATTAAATTCAAGGAGCTCAACACCTCTATATTACCTGATGGCAAAGGGATAACTAAGAGCTAG  
 ATCACCAACATGCATTACATGACTCACCATGAGTTGATGAGCAAATTGAATCAAAAATTGCATGGG  
 AATCAATTGAGACAAGTTGATACAACAAATCATTGATGGAAATTGAGTGGATTTATGAAATGTCGT  
 ACCATTGCTCTGATTGACCCCTGACGAAATAGTCATTGACATATCTTATTAAATACGTAGAAAG  
 CTACTCAACTTGAACCTACCATCCGGATATTATGGAATGCATTACTCCAGCTGCGATATCGAAA  
 GCAGGATTGTTATGTCAAATCCATTGACATATGCAGTTGAAATGATGAAAGAAACTAAAGATCATATG  
 AATGAAGAGTACATTAAATCAGAACAGATTAAATTGAAATCAAAGGGAGACCACAGTTACAAAC  
 TTGGAATTTCATTATTCAGATAATAGATCTGGTGGTTGATAAATTGATTGATGGATGGCGAGCCT  
 ATTGTTGGCGGAGTCTAAAGCTGATCTTAAATTAGTTGTTGTCCTGTTAAAATGAAAGAGGT  
 GAAAAGGGTATTGATGCCATAAGTTGCTCTTCTGCTATGAAAAAAATTCAAGAGGTTGTTGAT  
 AACTTGACATTAAGAAATATGCAAGGAGTTAACATAATTCAAAATGTAAGATTAAACTACTGTC  
 CTTGATGATAATATTAAATCAATGATTGTTTATCTCCATTGGAGATGAAATTAAAGTTCAA

**>Solyc07g008380.1.1, SHT4 :**

ATGGAGTCTAAGTCTTACAAAGATTCAAATCCTTCAAAAATATCATAAAATCAAATCATGTTAAT  
 GATGTTGATCACCCCAATAATTCAAATTATCTTCTTGATCAATTGCTTGTCAAATGCATGCCCT  
 GCTTCTTCTATCCAATCAAATTCCACCTCCCTAAAATTCCATTATACATGAAACAACCTCAACA  
 ATCATTGTCAGCTTAAAGTCATGTTATCCAGCATCAGGTAGATTTCATCTGATGCTCAATCTATC  
 AATTGTCATGATGAAGGTGTTGATATAAAGGCAAAGTTGATTCTCAATTGTTGATTCCTCAAG  
 GATGCACAAAAAGATATGCACCTAGCATGAATTGCTTCAAAATCAATCGTAACGATTGAAATTG  
 TCTCACTCCACTAGTTGAGTGCAGTGACGGAGTTGCTGTTGTAAGGGGCTAGCTTATCTG  
 AGCGCTGAACATGCCGTATTGATGGATTCACAGCATTGAAATTGTTACGAGTGGCTAAAGTGAGT  
 AAAATGGGAAATTAAAGATCAATTGCTTCACTTTGATGATTGTTGATCATTGTTCTGAAAGGAGT  
 GATAATTGTTAAAAAGAGTCGAGTCTCTAGAGATGATCATAATCATGATTGTTCTGAAAGGAGT  
 cGGAGGTTGTCATTAATCAATCAGTGATATCAAACCTAGGGAAACATGTTGGAGTGGTCAATCAGA  
 CCATCACGAGTTGAATTGGTATTGCTTCTATGGAGGGCTGTGATCAATGTTATCGATGTAAGGAGT  
 AATGGACGTTGAGACCTGTTATTGAGCGTCCCTGTGAATTACGTTGAAATTGACTTTCCAAGA  
 TACGAAAACCTCTTGGAAATTGCTATTGAGTCCCCTGCAAAATTCAATCCCAGGAGAAACAGGAAT  
 GGAGTTAAAAGACATTACTATTGATCAAGGACGTACAAAAAAAccaactatCATTGTAAGGAAATCTAG  
 TGATAATATATTGCTAGCATCAAAGTTCATGAAAGAAATAAGAATGGGAAGAAAATGAACAAG  
 TGGATGTGTCATGGCATCAAGTTATGTAGGTTCCCTATTAAATGAAGCTGATTGTTGGTGGGTAAAC

CTTGTGCTAAGTTGGATTGAGACGTAGTGATATGTTGGTTATGATACACAATGTGGAGTG  
GAATTGTTCTCAAGTAGATTGAAGAAAGAATACATGGACATGTTGGATGTGACAAAGATGTATTGT  
CTTCATTTGATGAGTAG

**>Solyc12g005430.1.1, SHT5 :**

ATGGAAATAGTTGTTAACGAAAATGATTGCAAAAGTTGAAATCTTATGCAAAAAGCTCATAAA  
GCCATCTCACCTACACCCCTCAGAACGTTACAAGCTCTTCTTGTCAAAATTGCTGAGAG  
AGAGCACATCCTGTTCTTCTATCCTATAATAATATTAGCCACACTATCGATGAACGTCTT  
GAGAAATCCCTTCTGATGTATTAACCATGTTATCCAGCAGCAGGAAGGTATGACGACAACGCTGA  
ATGTTGATTCTCTGTTGATCAAGGTGTTCCATACCAAAGCCAAGGTCAATTGTAAGCTTGGTAA  
TTCTTAGAGAAAACACGCAAGGATTGAGTGTGCAACTTATTGGGCCACATGAAAATAAGAAC  
TGGATCAAATAATTGTTATGGTATGCCAATTGTGATTATTCAAGTAACTAAATTGAATGTGGTGGCC  
TAGCTTATCATTCACTGTTACACCCCTGCAATGGATGGTTACAGGTTGCAATTCTATTGGT  
GGGAAAGTGTAGATTGGAACTCCATCGATAAGATTCAATTCTAAGCTCAATTAGGTAAAT  
TTTCCAACAAGAGATACTCAGCTTTCAACTCAGCCGACGTAGTAAATAGAGAAGAAAATATTG  
TTGTTAAGAGATTGTTGCTGAGCTGCTCTATCAAGGCTCAAAAACAATGCATTGATGAATCAG  
GCGGAGCTTGACTTTCAACCTCAAGGGTTGAAATAGTTACAGCAATCCTATGGAGGGCTTTATCC  
GCGCTTCAGCAGCTAGAAATGGGTTGTTAGACCTCTAATGGACTTCCATTGAATTACGCTCTA  
AATCATCTTACCTCAAGTAAAAACCTATGGAAATTACACAACCTCATAACATTAATTAGAAATACTATGAATAAAGTTGTT  
GCTTCATTGCCAACCTCACCAGATGAAATAGTGTCAACATTGTTGAATATATATAATCAAAGTTT  
ACATCACCAGAATGGGAGGTAAATGAAATTGACAAAGTGGATGTTCAAGTTATGCAAGTTCC  
TTGCAGGATATGATTGGTTGGAAAACCACCGTTAGTATATTGGTTGAAAGATATGGAAAT  
ATTGGTTATATGATACAGATTGTCACACTAGTGAATTGGTGTGCAATTGGACTTGAAGGAAAGTAC  
CATGCAATTATTGAGTGTGACAACGATATCAAAGCTCATGTTATACGCGATGCAAAACTTGA

**>Solyc03g117600.2.1, SHT6 :**

TGTGTTGATTTAGAGTATTCTCAACCCACTCTAACCATATTACACCCATAAAAAGCTCAACAAAC  
ATTATTCTGCTCCTCTCTTTTCAAAAGGAAACATAGTTGATTGATCGACGATGAAGATCGAGGT  
AAAAAACTCAACGATGGTGCAGCGCGACGGAGACGCCAACCTGAGGCTGTGAACTCTAATGTG  
GATTAGTAGTGCCTAATTCCACACGCCAGTGTGTTATTCTATAGGCCAACGGATCCCCAAATT  
TCGACGGAAAGTGTAAAGGAGGACTAAGCAAAGCCAGTGTGTTATCCGATGGCTGGAGA  
CTGTGCAGGGATGAAGATGGCGTATTGAGATTGAAAGGTCAAGGTGTGCTGTTGTGGAAGC  
TGAGTCCGACGGTGGATGATTGGCGATTTCGACCGACGGCTGGAGGCTCCGGCGACTTATTCC  
GGCCGTTGATTACTCACAAGGAATCGAATCGTATGCTCTTAGTATTGAGATAACACAGTTAAATG  
TGGGGAGTTCCCTGGAGTGGCATGCAACATCATGCAAGCAGATGGAGCTCTGGCTTCACCTCAT  
CAACACATGGTCCGACATGGCTCGTTAGACCTAACTATCCACCTTCATTGATCGTACCCCTC  
CGTGCCTGATCCACCTCAGCCTCAATTCCCCACGTCGAGTACCAAGCCACCTCCACTCTCAAGACA  
ACAGAAGAAAATGTGCCAATGCAGAAACTGTTCTGAAACGAGTGTGCAATCTCAAACAACTAACCG  
GGATCAAATCAATACCCCTCAAAGCTAAGTCAAAGAAGATGAAATACTGTAACACTACAGCTCATATG  
AGATGTTGGCAGGGCATGTGTGGCGCTCCACTTGATGGCACGAGGACTCACTCAGGATCAAGAAAACC  
AAGTTGACATAGCAACTGATGGCGTGCCAGGCTCCGACCTCTTCCACCGAGCTATTGGTAAT  
GTGATATTCACTGCCACTCCTGTTGCTGTTGATCTCAATCAAAGCTTATTGGTATGAGCCA  
GTAAAATCCATGATCAAATTGGCTATAATGGACAACGATTACTGAGATCAGCTCTGATTATTGGAAT  
TACAGCCTGACTTGAAGGCTAGTCGGCGGTGACATACATTAAGTGCCGAATTAGGAATAACTA  
GTGGTCTAGGCTGCCTATCCATGATGCTGATTGGATGGGAGGCAATTATTGGACCTGGTG  
GTATGCTTATGAAGGGTTAAGCTTATATTGCCAAGTCCCACATGATGGCAGTCAATCAGTGGCA  
TCTCTGCAAGCAGAACATATGAAACTTTGAGAAGTCTGTATGACATTGAAAGAAGCCGCTT  
CTTGTGCTGTTGATTGGGATTACAATACGGATATGTAAGAGACTCCCTTTATCTTTTTTT  
TTTCATTAGAGTTCTCTTGTGTTGCTGACATCAGTTTATTCTGATTCTATGATGCATTGATTATA  
TACTCAAAGTTACACTGCTAGTGTACATGTCTGTGAGGACCTCAATCTTCACTTCCACAAATGTG  
GCAAGATGTTAACTCAGAACGCTCTAGTAATTATTGAGTAGTACATATCTTTATTGCTAATATTCT  
TAG

**>Solyc12g096770.1.1, SHT7 :**

ATGGAAATGAAATCATATCCACAAAATTCAATTAAACCATCTCACCAACTCCAAATCATCTCCAAACT  
TACAAGTTAAGTTCTTGTCAAGTATCTGATGAGACACATTACCTCTGTTTTTTATCCTCCTAC  
CAACAACATTAATTCTCATCTCATGAGAACAACTTGAGCAATCCTTATCTAGGATTAACTCA  
TGTTCACCTATTCTGGTAGATTAAACGAAGATATTAACTCGATATCCTGCCAGGATCAAGGGTTAA  
ATTATAAAAGCAAAATGAATAGTAAACTCAATGAATTCTGATAAAGCACATAAGGATGTTAAC

TTTCACTGCTTGTGGCCTCAAGATTGAGATCCATCTAACTTACCATGCCACTTGT  
CATCATCCAAATCACCGAATTGAGTGTGGTGGCTCTATCTATGAGCCACATGCACATGACGAT  
GGATGGTTATTCAACTTTAGTTTATCAACGAGTGGCTAAAGTGTAGACATAAGATTCTTCTAGA  
GAAGATCGATTCATGAGCTTGTAGCTAATGTTTCAACGAGAGATTATCGAAGCTTCTATTG  
CCTCGTATACCTCCAGTAGATCGTGGAGTGTAAATTAGTAGCCAGGAGGCTATACATCAATGAAGA  
TTCTATTCAAGGCTAAGAGAAAAAGTTAGTGGAGATTATGCAAATTAAAGCCGTCAAGAGTTGAAA  
TGATTATGCCATCCATGGAGGGCTGTAATCCGTGCTCAGAAAAGAAGCACGGATATCTAAGACGT  
TCTTAATGAACATCCCTATAAATTGAGAAGTAGGTTGATTTCTCACCTCAAGTAGAGAAAATCATT  
GGGAATCTGGAGTTGACGCTCCTATAAAATTATACCTGAAGAGAACAGATGGAGTTGCACGAATT  
TGTAAACATTAATTACAACGCCGTGAAGGAAACTACTACTTGACAAAGACTTCACCGGAGGACA  
TAGTTCCCGCGGTGTCAAATATATAATGAAAGTTCTAGCACAAGATTGGGAGGAAATGATGAA  
GTTGATAGGATCATAAGTTCAAGTTGTAATTCTACAGAAGCTGATTTGGCTGGGAAAA  
CCATGTTGATGCATTGGATCAAGACATGGTCAAGTTGTTGGTTGATGACAGAATGTGGCAAT  
GGGATTGTTGCAAGTAGATTGAAGGAAGATAATATGAATCTATTGAATGTGACAATGATATCAA  
GGATTCTTCATTTAG

**>Solyc12g01980.1.1, SHT8 :**

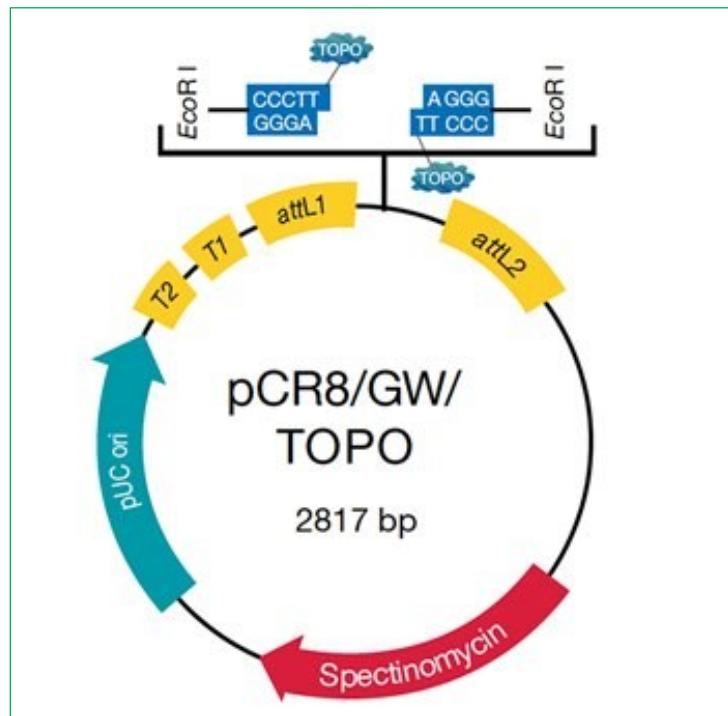
ATGAAAGATTCAATGCAAGTGAATTTGTCCAAAACCTCATTAAACCATCATTACCAACACCCAAA  
ACACCTTAAATATCACAAGTTATCTTCTTGATCAAGTTGCTGATGAGCACAATTGCCTCTTGTCTT  
TTCTATCCTCATTGTAAGAACAACTCGAAACATGAAGAGCTGTAAGAACATCCTATCGAGGATTATCA  
CATGTTACCCCTTAGCTGGTCGATTGCTGAAGATGATGAATCATTAATTCTTGCTTGTATCAAGGTG  
TTACTTATATCAAAGCAAAGGTCAATTGTAACCTTGATGATTACTCAACAAACAAAAAGACCTTG  
ATCTAGCCTTGTCAATTGGCCTCAAGGTACGATGGATGTTGACTCTAATTGTTGTCACGCCACT  
TATGGTTGTCAGTCACGACATTGAATGTTGGGTCTAGCCCTAGCTATTAGCATTGCACATCCTGT  
TATGGACGGATGCACCACATTCAAACATTCTTATGAATGGACCAAGTGTGCAAATTGGTACTCCTTC  
TAAGGAAATCAGCTTGTCAATTGAAATTGAGGTGCTCTTCCCTACAAGCACGATTATCAACCC  
CCTTGAGCCTCCGGTTGATGAAGGCAAACGCAAAGACTCTAAGTTAATTGCGAGGAAGTTGTTTGA  
GAAAGATGCAATATCGAGGCTCAGAGAGAAATTGATTCCATAAGTGAAGTTAGGTTAACACCT  
CTCGAGTTGAGATGATTACAGCACTTTATGGAGGTCACTTATCCGTTCCAGAAAAGTGCACAAATTGA  
AACGTTCTGTAATTCCACTTAACCTGCGCGTAAGGTAGCAGATTTCCTGAAATTACAGACT  
CCTTGGGAATCTTATTGAAAGTTCTATAAAATTGAGCACGATGATGAAACGAAAATAGAGTCGC  
TGCATCAGATCGAAAATCTACAAAGAGTCTGTTAAAGTGAATACAATAATGCGTCAAAGCTACT  
CCAGATGAAATAATTCTTGGTTATCGACTTACAGGATAGTTACTCTGGATTAGAATGGGAGGA  
GACGATGAAAGTTATGAATTTCAGAGCTCAAGTTATCTAGGTTCCCATACAAAAACAGATTGGT  
TGGGAAACCTAGTTAATGCATTGGGTCAAGACATAATCAAGTTGTTGATGACTGAA  
TGTGAGACTGGAATTGTTGTGCAAATGGATTGGAGAAAAACACATGGATAACTTGTGTGACCA  
AGATATCATCGATTGCAAATTAG

**2. Description des gènes candidats transférases (SHT) :**

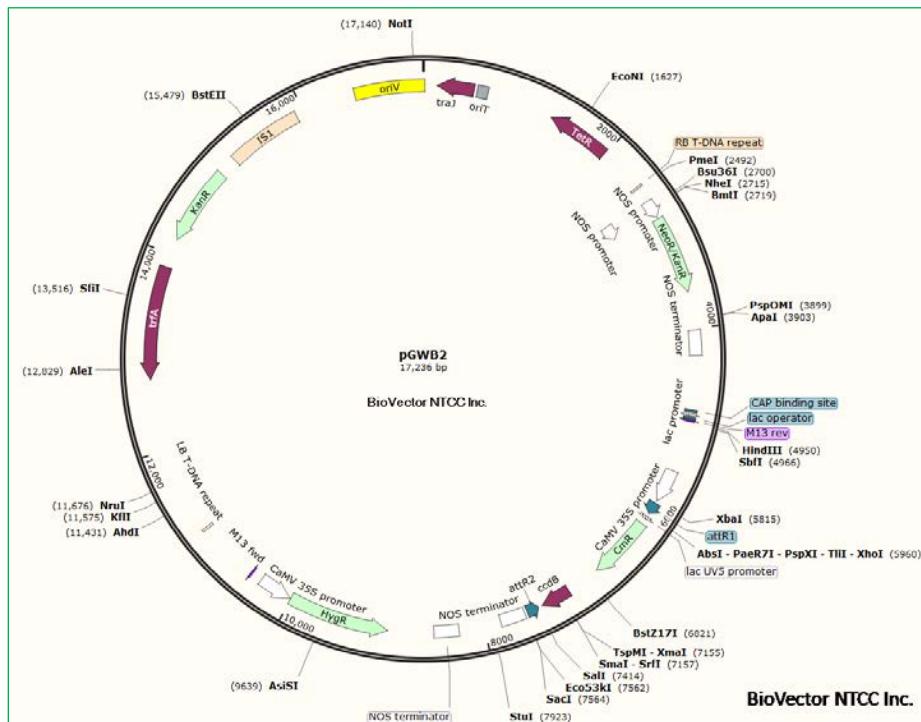
Les informations citées dans le tableau suivant (tableau X) proviennent de ncbi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), solgenomic (<https://solgenomics.net/>), TED ((Tomato functional Data Base <http://ted.bti.cornell.edu/cgi-bin/TFGD/digital/expression.cgi>) et Tomato Expression Atlas (<http://tea.solgenomics.net/>)

Gène	Identification ncbi	Identification solgenomic	expression	Description
<b>Solyc07g008390 (SHT1)</b>	Salutaridinol-7-O-cetyl transferase like	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase	- Feuilles de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> ( rang 23 de la banque ARN seq). -Faible dans feuille <i>S.lycopersicum</i> et <i>S.pimpinellifolium</i> -Jeunes bourgeons floraux, et 10 jours après la floraison puis diminue	-Clade NaDH29 -Restreint aux solanacées -ADN c est identique de Solyc07g008380 (SHT4).
<b>Solyc02g093180 (SHT2)</b>	Uncharacterized acetyltransferase	Hydroxycinnamoyl-benzoyl transferase-like	-Feuilles de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> (rang 47 de la banque ARN seq). -Forte dans les fruits mûrs -Très forte dans les boutons floraux -Peu de réponse à l'infection bactérienne	-Ne fait pas partie de cluster identifié de N-hydroxycinnamoyl transferases -Difficilement classable parmi les clades BAHD (proche du clade la)
<b>Solyc05g015800 (SHT3)</b>	Methanol O-anthraniolyl transferase	Acetyl coenzyme A cis-3-acetyl hexen-1-ol transferase	-Expression augmente par infestation de tomate par <i>T.absoluta</i> -Fruits murs de <i>S.pennellii</i> et plus dans les fruit mur de <i>S.lycopersicum</i> (Heinz) -Modérée à des agent bactérien plutôt dans le péricarpe des fruits.	-Clade Va des BAHD -Forte identité (79%) avec une anthraniloyltransferase de poivron (NCBI) -Référence comme Acetyl coenzyme A cis-3-hexen-1-ol acetyl transferase; synthèse de composés volatiles
<b>Solyc07g008380 (SHT4)</b>	Salutaridinol-7-O-cetyl transferase like	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase	-Feuilles de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> (rang 127 de la banque ARN seq) -profil très similaire à celui de SHT1	-Clade NaDH29 -Proche de Solyc07g008380 (SHT1) -Restreint aux solanacées
<b>Solyc12g005430 (SHT5)</b>	Acetyl-CoA-benzylalcohol acetyltransferase-like	Acyltransferase-like protein	-Augmente d'un facteur 10 dans les feuilles de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> -Très faiblement exprimé dans le fruit et un peu dans les fleurs. -Fort dans les jeunes feuilles -Fort expression dans les inflorescences et méristèmes -Réponse à l'infection bactérienne.	-Cluster NaDH29 -Restreint aux solanacées
<b>Solyc03g117600 (SHT6)</b>	Shikimate O-hydroxycinnamoyl transferase	Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase	-Augmente d'un facteur de 10 dans les feuilles de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> -Expression constitutive avec une réponse à l'infection bactérienne.	
<b>Solyc12g096770 (SHT7)</b>	Acetyl-CoA-benzylalcohol acetyltransferase-like	Hydroxycinnamoyl quinate transferase	-Augmente d'un facteur de 10 dans les feuilles de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> -Bourgeons, les feuilles matures et jeunes -Réponse à l'infection bactérienne	-Cluster NaDH29 -Restreint aux solanacées -50% d'identité avec une spermine transférase de <i>S.melongena</i>
<b>Solyc12g010980 (SHT8)</b>	Acetyl-CoA-benzylalcohol acetyltransferase	Acetyltransferase-like protein	-Augmente d'un facteur de 10 dans les feuilles de tomate infestées par <i>T.absoluta</i> -Bourgeons, les feuilles matures et jeunes -Réponse à l'infection bactérienne	-Cluster NaDH29 -Restreint aux solanacées -70% d'identité avec une spermine transférase de <i>S.melongena</i>

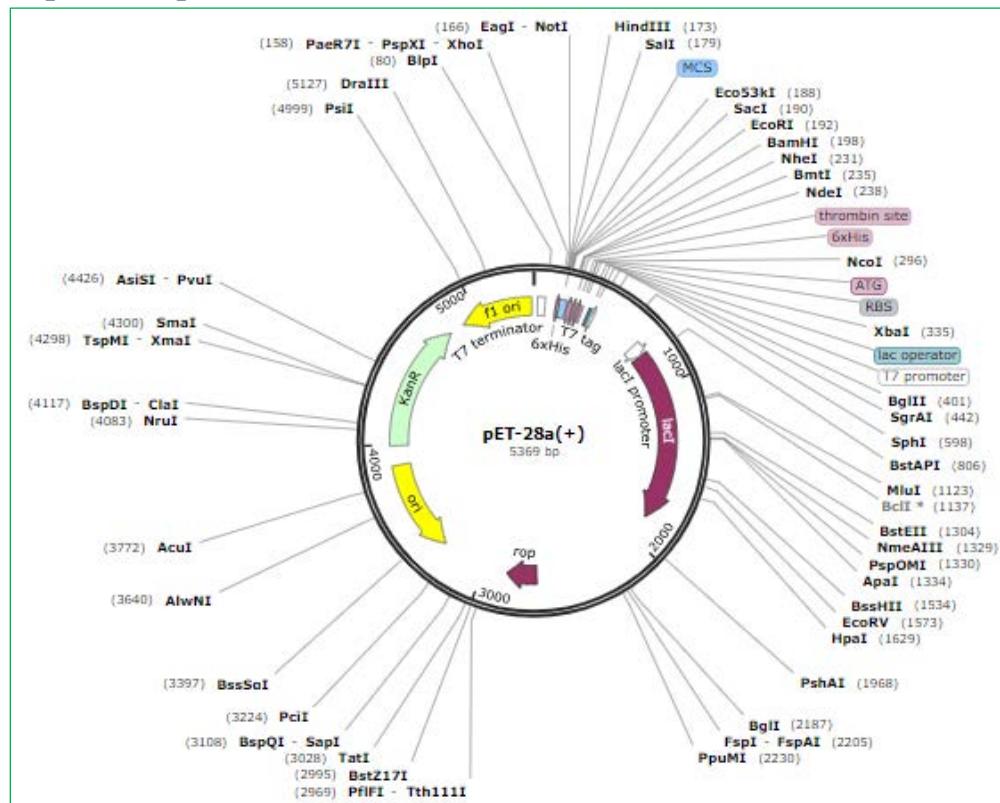
### 3. Carte du plasmide pCR™8/GW/TOPO™



#### 4. Carte du plasmide pGWB2 Gateway binary vector (BioVector NTCC Inc.)



## 5. Carte du plasmide pET-28a



## 6. Préparation des *E.coli* MC1022 électrocompétentes

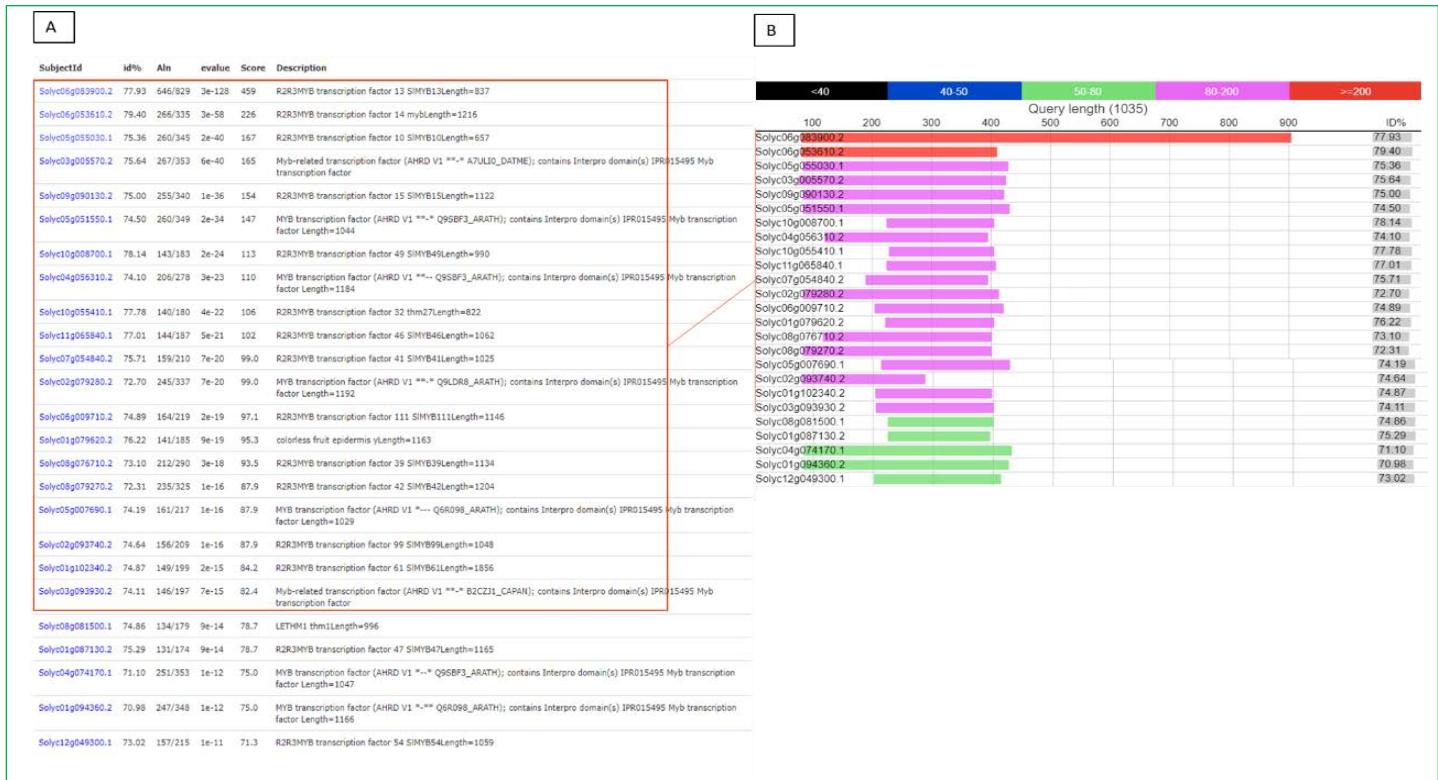
A partir d'un stock glycérol (-80°C), des bactéries sont étalées sur milieu solide (LB) et incubées toute la nuit à 37°C. Le lendemain une colonie de la boîte est ensemencée dans 30 mL de LB et incubée à 37°C/180 rpm pendant 16 heures. A partir de cette pré-culture 10 mL sont utilisés pour ensemencer 200 mL du LB liquide. La culture de 200 mL est incubée à 37°C/180 rpm jusqu'à atteindre une D.O entre 0.6 et 0.8. Une fois la bonne D.O est atteinte la culture liquide est posée sur glace pendant 30 minutes suivie d'un centrifugation 15 minutes 4°C/2200 g. Le culot est re-suspendu dans 20 mL d'eau osmosée froide et stérile pour faire le premier lavage puis centrifugé 15 minutes 4°C/2200 g. Cette étape de lavage est répétée 2 fois de plus. Après le dernier lavage le culot est re-suspendu dans 15 mL de glycérol 10% (froid et stérile) et centrifuger pour la dernière fois (15 minutes 4°C/2200 g). Ensuite le culot est re-suspendu dans 1 mL de glycérol 10% (froid et stérile) et laissé reposer sur glace pendant 30 minutes. Enfin la suspension est aliquotée par volume de 45 µl dans des tubes stériles et congelée dans de l'azote liquide puis stockée à -80°C.

## 7. Préparations des Agrobactéries EHA105 électrocompétentes

A partir d'un stock glycérol (-80°C) des agrobactéries sont étalées sur milieu solide (LB+rifampicine) et incubées à 28°C jusqu'à l'apparition des colonies. Une colonie de la boîte est

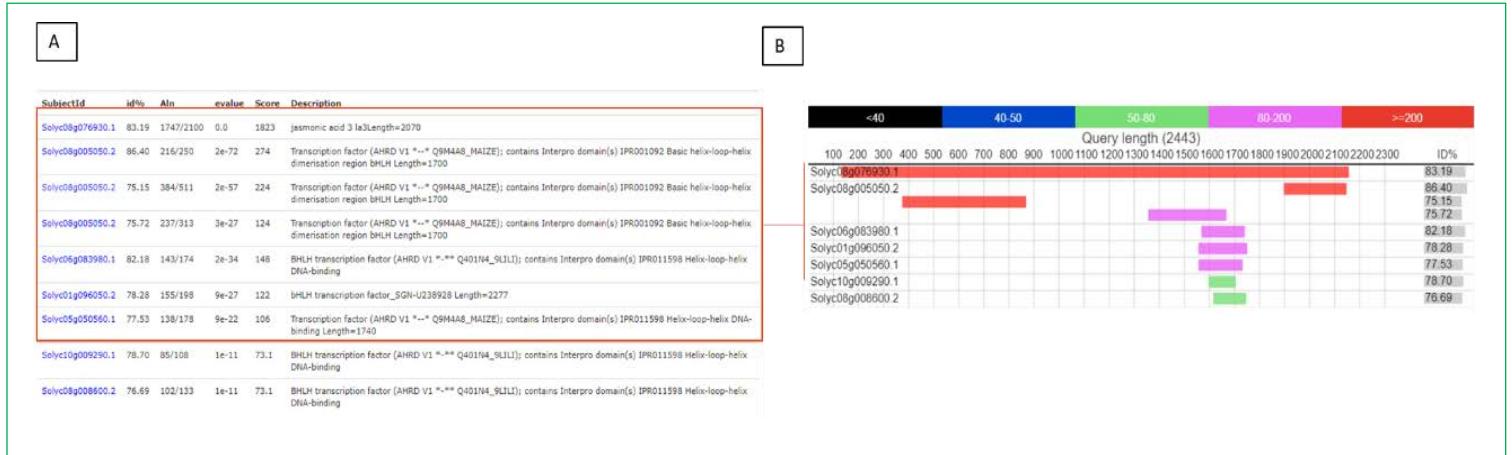
ensemencée dans 5 mL de LB et incubée à 28°C/2000 rpm pendant 16 heures. A partir de cette pré-culture 2 mL sont utilisés pour ensemencer 50 mL du LB liquide. La culture de 50 mL est incubée à 28°C/2000 rpm jusqu'à atteindre une D.O entre 0.6 et 0.8. Une fois la bonne D.O est atteinte la culture liquide est posée sur glace pendant 30 minutes suivie d'un centrifugation 10 minutes 4°C/3000g. Le culot est re-suspendu dans 45 mL d'eau osmosée froide et stérile pour faire le premier lavage puis centrifugé 10 minutes 4°C/3000g. Cette étape de lavage est répétée 2 fois. Après le dernier lavage, le culot est re-suspendu dans 40 mL du glycérol 10% (froid et stérile) et centrifuger pour la dernière fois (10 minutes 4°C/3000g). Ensuite, le culot est re-suspendu dans 500 µl de glycérol 10% (froid et stérile) et aliquotée par volume de 45 µl dans des tubes stériles et congelée dans de l'azote liquide puis stockée à -80°C.

## 8. BLAST nucléotidique pour NaMYB8



**Figure 77:** Les gènes homologues à NaMYB8 chez la tomate par BLAST. A : La liste des gènes homologues à NaMYB8 (1035pb) par BLAST sur le génome de la tomate (<https://solgenomics.net/>), subjectId : le gène, id% : pourcentage d'homologie, Aln : nombre de nucléotides homologues par rapport à la taille de la séquence qui présente une homologie avec NaMYB8. B : les séquences homologues de chaque gène sont représentées en couleur. Ces couleurs varient selon le nombre des nucléotides homologues, Query length : taille du gène NaMYB8, ID% : pourcentage d'homologie.

## 9. BLAST nucléotidique pour NaMYC2



**Figure 78:** Les gènes homologues à NaMYC2 chez la tomate par BLAST. A : La liste des gènes homologues à NaMYC2 (2443pb) par BLAST sur le génome de la tomate (<https://solgenomics.net/>), subjectId : le gène, id% : pourcentage d'homologie, Aln : nombre de nucléotides homologues par rapport à la taille de la séquence qui présente une homologie avec NaMYC2. B : les séquences homologues de chaque gène sont représentées en couleur. Ces couleurs varient selon le nombre des nucléotides homologues, Query length : taille du gène NaMYC2, ID% : pourcentage d'homologie.

## 6.10. UPLC

Les analyses phytochimiques sont réalisées en chromatographie liquide à ultra-haute performance (UPLC) (Chaine UPLC Nexera, Shimadzu, Kyoto, Japon), équipée d'un détecteur UV SPDM20A (Shimadzu) et couplée à un spectromètre de masse à simple quadripôle LCMS2020 (Shimadzu). La colonne utilisée pour la séparation des phénolamides est en C18 en phase inverse (ZORBAX Eclipse Plus 150 ou 100 × 2,10 mm ; taille de particule = 1,8 µm ; Agilent Technologies) équipée d'une pré-colonne (1290 Infinity, Agilent Technologies). L'élution est réalisée dans du méthanol additionnée de 0.1% d'acide formique et de l'eau ultra pure contenant 0.1% d'acide formique. Le débit est de 0,2mL/minute et le volume d'injection est de 5µl. De manière générale, les analyses sont réalisées en enregistrant le spectre UV entre 200 et 600nm ainsi que le TIC (total ion chromatographie) en ionisation positive et négative sur la gamme de m/z 100-1200. Dans le cas précis des criblages d'activité enzymatiques une analyse en SIM(Selected Ion Monitoring) a été conduite en ciblant les produits de métabolisation attendus .Les données sont traitées par le logiciel LabSolution puis exportées sous tableur Excel

Tableau 23: Masse des différentes molécules

Nom	M/Z(+)
Caféoylputrescine	251
Kukoamine A/B	531
N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine	695
N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine	474
Caféoylspermidine	310
Caféoylspermine	367
Putrescine	89
Spermine	203
Spermidine	146
Taxifoline	305

### 6.11. Étude comparative des teneurs en phénolamides dans les feuilles et tiges de tomates soumises ou non à l'herbivorie de *T. absoluta*

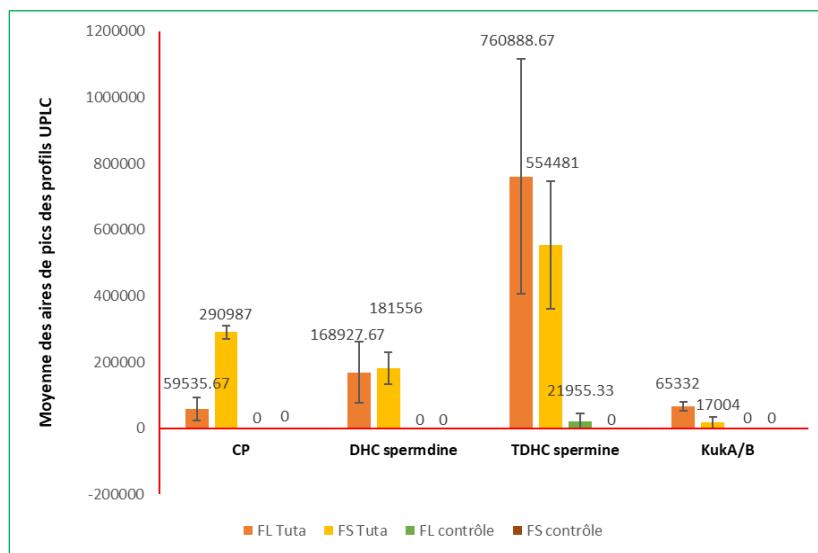
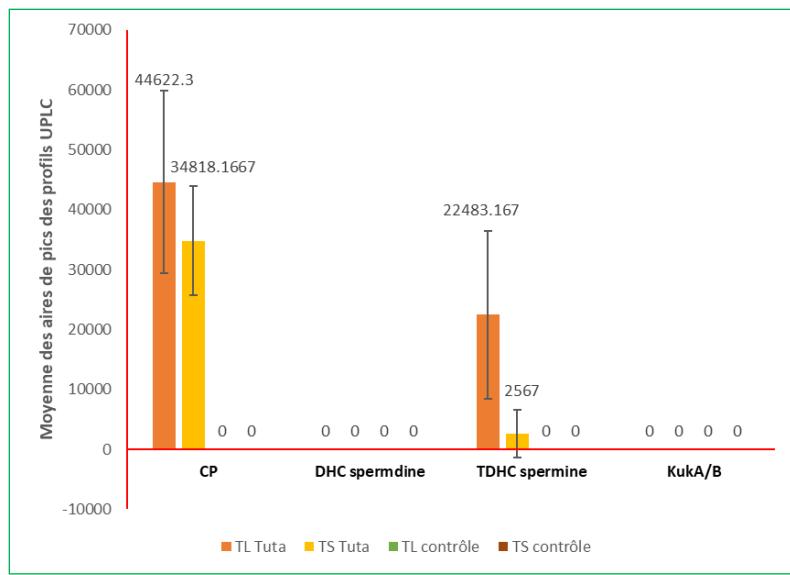


Figure 79: Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les feuilles locales (FL) et systémiques (FS) des plantes de tomate infestées par *Tuta* et des plantes contrôles non infestées CP : Caféoylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. Kukoamine A et B.  $p < 0.05$



**Figure 80:** Moyennes des aires de pics des molécules détectées dans les tiges locales (TL) et systémiques (TS) des plantes de tomate infestées par Tuta et des plantes contrôles non infestées CP : Caféoylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. KukoA/B : Kukoamine A et B.

## 6.12. Teneur des extraits bruts en phenolamides.

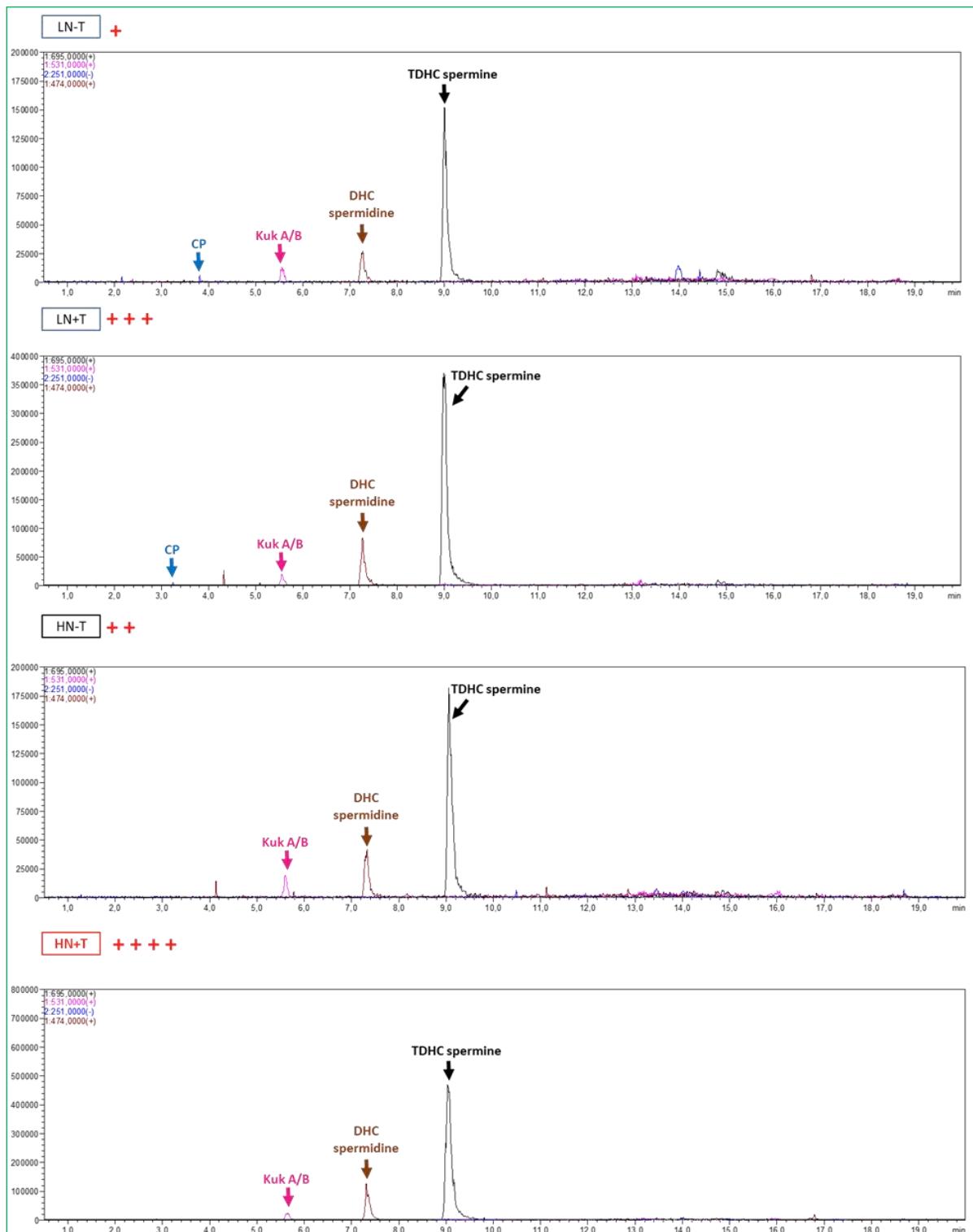


Figure 81: Chromatogramme des analyses UPLC de la teneur en phénolamides de l'extrait LN-T. CP : Caféoylputrescine, DHC spermidine : N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl) spermidine, TDHC spermine : N1, N5, N14-tris-(dihydrocaféoyl) spermine. KukA/B : Kukoamine A et B.

## Annexe 2

# Phenolamides in plants: An update on their function, regulation, and origin of their biosynthetic enzymes

Marwa Roumani, Sébastien Besseau, David Gagneul, Christophe Robin,  
Romain Larbat

## ► To cite this version:

Marwa Roumani, Sébastien Besseau, David Gagneul, Christophe Robin, Romain Larbat. Phenolamides in plants: An update on their function, regulation, and origin of their biosynthetic enzymes. *Journal of Experimental Botany*, Oxford University Press (OUP), 2020, 10.1093/jxb/eraa582 . hal-03066081

HAL Id: hal-03066081

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03066081>

Submitted on 15 Dec 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution | 4.0 International License

# Phenolamides in plants: An update on their function, regulation, and origin of their biosynthetic enzymes

Marwa Roumani, Sébastien Besseau, David Gagneul, Christophe Robin,  
Romain Larbat

## ► To cite this version:

Marwa Roumani, Sébastien Besseau, David Gagneul, Christophe Robin, Romain Larbat. Phenolamides in plants: An update on their function, regulation, and origin of their biosynthetic enzymes. *Journal of Experimental Botany*, Oxford University Press (OUP), 2020, 10.1093/jxb/eraa582 . hal-03066081

HAL Id: hal-03066081

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03066081>

Submitted on 15 Dec 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Phenolamides in plants: An update on their function, regulation, and origin of their biosynthetic enzymes

Marwa Roumani<sup>1\*</sup>, Sébastien Besseau<sup>2\*</sup>, David Gagneul<sup>3</sup>, Christophe Robin<sup>1</sup>, Romain Larbat<sup>1‡</sup>

<sup>1</sup>UMR 1121, Laboratoire Agronomie et Environnement (LAE), Université de Lorraine-INRAe, Nancy, France,

<sup>2</sup>EA 2106, Biomolécules et biotechnologies végétales (BBV), Université de Tours, Tours, France,

<sup>3</sup>UMR 1158, BioEcoAgro, Université de Lille, INRAe, Université de Liège, UPJV, YNCREA, Université d'Artois, Université Littoral Côte d'Opale, Institut Charles Viollette (ICV), Lille, France

[marwa.roumani@univ-lorraine.fr](mailto:marwa.roumani@univ-lorraine.fr)  
[sebastien.besseau@univ-tours.fr](mailto:sebastien.besseau@univ-tours.fr)  
[david.gagneul@univ-lille.fr](mailto:david.gagneul@univ-lille.fr)  
[christophe.robin@univ-lorraine.fr](mailto:christophe.robin@univ-lorraine.fr)  
[romain.larbat@univ-lorraine.fr](mailto:romain.larbat@univ-lorraine.fr)

\* These authors contributed equally to the work presented.

‡ Correspondence:

Romain Larbat

[romain.larbat@univ-lorraine.fr](mailto:romain.larbat@univ-lorraine.fr)

## Highlights:

This paper reviews the functional aspects of phenolamides in plants, the molecular regulation of their biosynthesis in response to biotic stress, and prospects for their phylogenetic origin through classification of N-hydroxycinnamoyltransferases

## **Abstract**

Phenolamides represent a family of specialized metabolites, consisting of the association of hydroxycinnamic acid derivatives with aliphatic or aromatic amines. Since the discovery of the first phenolamide in the late 1940's, decades of phytochemical analyses have revealed a high structural diversity for this family and a wide distribution in the plant kingdom. The occurrence of structurally diverse phenolamides in almost all plant organs has led to early hypotheses on their involvement in floral initiation and fertility, as well as plant defense against biotic and abiotic stress. In the present work, we critically review literature ascribing functional hypotheses to phenolamides and recent evidence on the control of their biosynthesis in response to biotic stress. We additionally provide a phylogenetic analysis of the numerous N-hydroxycinnamoyltransferases involved in the synthesis of phenolamides and discuss the potential role of other enzyme families in their diversification. The data presented suggests multiple evolutionary events that contributed to the extension of the taxonomic distribution and diversity of phenolamides.

**Keywords:** bioactivity, phenolamides, plant defense, plant reproduction, phylogenesis.

## Introduction

Specialized metabolism continuously expands during evolution of the green lineage. This has generated an enormous chemodiversity, largely responsible for the tremendous adaptability of plants to their challenging environment. Specialized metabolites arising from this metabolism provide plants with a plethora of molecules that allow their interaction (defense, protection, or attraction) with their abiotic (UV, temperature, and water deficit, among others) or biotic (pathogens and insects, among others) environments. Among these compounds, phenolamides, also termed hydroxycinnamic acid amides or phenylamides, have generated considerable attention recently. Phenolamides arise from phenolic moieties (mainly hydroxycinnamic acids and derivatives) covalently linked through amide bonds to an aromatic monoamine or an aliphatic polyamine (e.g. tyramine, agmatine, anthranilate, spermidine). Therefore, these phenolic compounds can be considered alkaloids. Their synthesis is positioned at the crossroads of the phenylpropanoid pathway and the metabolism of amines (Bassard et al., 2010) (Fig. 1; Sup. Fig. 1).

Feruloylputrescine was the first phenolamide identified in the middle of the twentieth century (Ryabinine and Ilina, 1949). Since then, a plethora of structures have been elucidated (Fig. 1; Sup. Fig. 1) and theoretical phenolamide diversity could reach more than 5000 compounds. Phenolamides have been described throughout the plant kingdom and they accumulate in various organs, sometimes at very high concentrations, especially in wounded tissues (Roepenack-Lahaye et al., 2003; Zácarés et al., 2007; Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012), at the surface of pollen grains, in flowers, and in seeds (Meurer et al., 1998; Grienberger et al., 2009; Luo et al., 2009; Vogt, 2018). Although phenolamide structure and distribution are now well documented (Martin-Tanguy et al., 1978; Luo et al., 2009; Kaur et al., 2010; Dong et al., 2015), their physiological or biological roles are still poorly understood. Their implication in plant defense against pathogens and herbivores has been suggested and sometimes demonstrated (Zácarés et al., 2007; Kaur et al., 2010; López-Gresa et al., 2010; Alamgir et al., 2016). However, no clear function is associated with their presence in large amounts in floral organs and the pollen coat (Fellenberg et al., 2009; Grienberger et al., 2009; Vogt, 2018). Concomitant with the discovery of phenolamide diversity, characterization of N-hydroxycinnamoyltransferases involved in their synthesis highlighted the complexity of phenolamide appearance in the green lineage, resulting from numerous and independent gene emergence. This gave clues to explain the origins of structures, their diversity, and species/organ specificity of phenolamides (Bassard et al., 2010; Elejalde-Palmett et al., 2015).

A review of the literature on phenolamides reveals three main periods of research conducted on these molecules (Fig. 2). From 1949 to 2007, the structure of the first major phenolamides was elucidated, and the enzymes involved in their synthesis were identified as a new type of enzyme with N-hydroxycinnamoyltransferase activity. Their roles have been hypothesized in development and flowering, as well as in the defense of the plant against abiotic stress, injury, and pathogen attack. This period was the subject of two main reviews (Facchini et al., 2002; Edreva et al., 2007). The second period (2007 to 2015) was marked by an increase in the number of phenolamide structures reported due to the democratization and improvement

of instrumental tools for phytochemical analysis, by proof of their role in defense against insects and by the discovery of genes encoding new enzymes, including spermidine and putrescine N-hydroxycinnamoyltransferases. The first elements of their synthesis regulation were compiled in the review of Bassard et al. (2010). Since then, so called „omic“ approaches have been applied to phenolamides and more plant species have been investigated (Li et al., 2018). Phenolamide accumulation appears as a conserved chemical trait in the pollen coat of core Eudicotyledons, suggesting an important role of these molecules in pollen biology. The acquisition of transcriptomic data in different non model or model plants has made it possible to explore phenolamide biosynthesis enzyme phylogenesis and help N-hydroxycinnamoyltransferase orthologue identification among plant species, increasing the number of characterized enzymes from 21 to 43. Concomitantly, major advances have been made on the regulation of their biosynthesis in response to biological aggressors (Onkokesung et al., 2012; Yogendra et al., 2015, 2017; Schäfer et al., 2015; Fagin et al., 2020).

From this founding work and the most recent research, we describe the newly discovered occurrence of phenolamide diversity in reproductive organs and their possible functions in reproduction. The defensive role of phenolamides in response to biotic and abiotic stress is then described with an emphasis on the regulation of their biosynthesis and their specific role. In the last part of the review, we describe the enzymes involved in the metabolism of phenolamides and explore the origin of N-hydroxycinnamoyltransferases. Chemistry, biotechnological production, and health benefits of phenolamides were not detailed here as two recent reviews already summarized these aspects (Wang et al., 2020; Roumani et al., 2020).

## 1. Biological roles of phenolamides

### 1.1. Role in reproduction

#### 1.1.1. Phenolamides in relation to floral initiation and flower fertility

Mono- and di-putrescine, spermidine and spermine phenolamides are considered to be involved in plant development and, like free polyamines, could behave as plant growth regulators (Tiburcio et al., 1993; Martin-Tanguy, 1997; Edreva et al., 2007). Indeed, several studies indicate that their relative contents are closely related to biological processes, such as cell proliferation, callus formation, cell differentiation, embryogenesis, or organogenesis (Edreva et al., 2007). Nevertheless, these findings often rely on correlations and no direct evidence was provided until now. A link between floral initiation, flower fertility, and phenolamide accumulation was established decades ago, but molecular evidence was missing. In several plant families, such as Solanaceae, Brassicaceae, Asteraceae, and Araceae, the accumulation of phenolamides to a high level in the upper leaves and apices appears to precede floral initiation (Cabanne et al., 1981; Martin-Tanguy, 1985; Martin-Tanguy, 1997). Consistently, mutant plants that fail to flower do not accumulate phenolamides (Martin-Tanguy, 1985). In addition, the accumulation of phenolamides seems to be linked to flower fertility (Bassard et al., 2010). In *Brassica juncea*, the level of soluble and insoluble phenolamides (derived from mono and di-substituted putrescine, spermidine, or

spermine) was shown to be lower in cytoplasmic male sterile plants than in the wild-type plants during flower development, which is consistent with a putative role in fertility (Guo et al., 2003). Phenolamides could act as ROS scavenging molecules, among other, during flower development, thus, preventing oxidative damage, leading to pollen abortion in cytoplasmic male sterile plants, as suggested in soybean (Ding et al., 2019).

### 1.1.2. Phenolamides in the pollen coat of Eudicotyledons

The pollen cell wall is very sophisticated and complex. The mature pollen grain is generally composed of three layers. The inner part of the pollen cell wall, known as the intine, is synthesized by the microspores themselves, while the outer part, called the exine, is produced by the surrounding sporophytic tapetal cells and deposited on the surface of the maturing pollen grain within the locules of the anthers (Hess, 1993; Ariizumi and Toriyama, 2011). While the intine ensures pollen structural integrity during pollen maturation, the exine encapsulates and sculpts the pollen grain, providing mechanical and chemical protection and playing a role in the pollen-stigma interaction. In most species, the pollen grain is additionally covered by another layer called the pollen coat or tryphine. Constituting the most outer part of the pollen grain, the pollen coat plays a role in multiple mechanisms, such as pollen-stigma recognition, self-incompatibility, pollen adhesion to pollinators, protection against abiotic and biotic stress, and pollen hydration. Like the exine, precursors required for the formation of the pollen coat originate from the tapetal cells. The chemical composition of the pollen coat is highly variable among species, but a common feature is the accumulation of phenolamides (Grienberger et al., 2009; Quilichini et al., 2015). They are accumulated in the pollen coat of nearly all core Eudicotyledons (Elejalde-Palmett et al., 2015; Delporte et al., 2018). They are absent in the pollen wall of Gymnosperms, and only one Monocotyledon, *Canna indica*, was shown to accumulate such compounds, although at trace levels (Elejalde-Palmett et al., 2015). This chemical trait was described several decades ago but more detailed analyses have been undergone recently, notably, through the characterization of the molecular determinants responsible for their accumulation as discussed below (Elejalde-Palmett et al., 2015; Delporte et al., 2018). Particularities of these phenolamides are that they are derived from aliphatic polyamines and are fully substituted, *i.e.* primary and secondary amines are acylated. Until recently, trihydroxycinnamoyl spermidines were considered a unique marker of the pollen coat of Eudicotyledons (Elejalde-Palmett et al., 2015). As a constituent of the pollen coat, trihydroxycinnamoyl spermidines were shown to be produced in the tapetal cells and deposited on the outer surface of the pollen grain (Grienberger et al., 2009; Elejalde-Palmett et al., 2015). The decoration of spermidine varies between species, *i.e.* aromatic moiety of the phenolics can differ (from *p*-coumaroyl to sinapoyl, see Fig. 1 and Sup. Fig. 1 for a list). For example, in *Arabidopsis*, two main phenolamides were shown to accumulate in the pollen coat, *i.e.* tri(5-hydroxyferuloyl) spermidine and di(5-hydroxyferuloyl)-sinapoylspermidine, whereas in apple trees, tricoumaroyl spermidine and dicoumaroyl-caffeoyspermidine were the main molecules (Grienberger et al., 2009; Elejalde-Palmett et al., 2015). Nevertheless, very recently, Delporte et al., (2018) showed that, in the Asteraceae family, fully substituted spermine derivatives were the main phenolamide accumulated in the pollen coat. In the species of this family, spermidine derivatives were present but at a lower concentration. The acylation pattern of spermine can

vary, depending on the species, in this family. Spermine could be acylated with *p*-coumaric and/or caffeic acid (Delporte et al., 2018). For instance, N<sup>1</sup>, N<sup>2</sup>, N<sup>3</sup>-, N<sup>1,2,3,4</sup>-tetracoumaroylspermine was accumulated in chicory. This study showed that fully substituted aliphatic polyamines are indeed a marker of the Eudicotyledons, but fully substituted spermine derivatives are markers of the pollen of the Asteraceae family (Delporte et al., 2018).

The role of the fully substituted phenolamides derived either from spermidine or spermine is still under debate, and because they are restricted to the pollen coat, they are often considered separately from the other phenolamides (Fellenberg and Vogt, 2015; Vogt, 2018). The fact that their accumulation in the pollen coat is a chemical trait preserved during the evolution of the green lineage suggests that they must play a role of paramount importance. The occurrence of spermine derivatives in replacement of spermidine derivatives in Asteraceae is also intriguing and deserves attention. This metabolic diversification may reflect an evolutionary advantage that still needs to be uncovered (Delporte et al., 2018). In the *Arabidopsis* mutant *Atsht*, where phenolamides are totally absent in the pollen coat, no clear phenotype was highlighted (Grienberger et al., 2009). The pollen morphology was slightly altered, suggesting a role in sporopollenin ultrastructure, but the pollen grain was still viable and fertile (Grienberger et al., 2009). Because of the hydroxycinnamoyl spermidine absorption spectra, they were predicted to be involved in UV protection. Nevertheless, pollen grains depleted in spermidine derivatives isolated from *Atsht* mutants did not show any impairment of their ability to germinate or to grow a pollen tube *in vitro*, as well as *in vivo* (Grienberger et al., 2009). The effects of UV irradiation have not been examined at the DNA level. It is possible that phenolamides have a role in protecting genetic information inherited by offspring. This may explain why their accumulation in the pollen coat was maintained through evolution of the green lineage. Further experiments are needed to test this hypothesis. A role of phenolamides in the control of polyamine homeostasis was suggested (Fellenberg et al., 2012). Indeed, polyamines are involved in multiple physiological processes and their intracellular pools need to be finely tuned through compartmentation, control of their synthesis (transcriptional and translational regulation) and degradation, and eventually through conjugation (Bouchereau et al., 1999). Nevertheless, analysis of the *Atsht* mutant showed no alteration of free polyamine levels (Fellenberg et al., 2012). Experiments done *in vitro* with phenolamides extracted and partially purified from bee pollen evidenced the putative role of these molecules in oxidative stress protection (Zhang et al., 2020). Additionally, some antifungal properties were also reported for phenolamides accumulated at the surface of sunflower pollen (Kyselka et al., 2018). In addition, by comparison to phenolamides accumulated in other parts of the plant (see below), multiple roles have been tentatively assigned to their accumulation in the pollen coat, such as protection against abiotic or biotic stress (desiccation resistance, antifungal activity, insect interaction, antimicrobial activity), function in the stigma-pollen interaction, and pollen germination (Grienberger et al., 2009; Elejalde-Palmett et al., 2015; Fellenberg and Vogt, 2015; Delporte et al., 2018; Vogt, 2018). Notably, *Arabidopsis* is a self-pollinated species and its pollen is not exposed to harsh environments. Studies with other species may help to solve this question. With the

emergence of new genome editing methods, mutants of other crop species may become available to test these hypotheses.

## 1.2. Protective roles against biotic stresses

### 1.2.1. Pathogens

Since the first demonstration of *p*-coumaroyl- and feruloyl-2-hydroxyputrescine accumulation in leaves of rust-infected wheat (Samborski and Rohringer, 1970), multiple studies on Solanaceae, Brassicaceae, and Poaceae confirmed that phenolamide accumulation in response to microbial infection is a global trend (Negrel and Jeandet, 1987; Torrigiani et al., 1997; Roepenack-Lahaye et al., 2003; King and Calhoun, 2005; Zácarés et al., 2007; Muroi et al., 2009; Lopez-Gresa et al., 2016; Royer et al., 2016; Morimoto et al., 2018; Ube et al., 2019a,b). Except for tri-substituted spermine derivatives, all classes of phenolamides appear to be involved in these interactions. However, no clear rule has been identified linking the nature of the induced phenolamide to the nature of the pathogen or plant species (Roepenack-Lahaye et al., 2003; Baker et al., 2005; Zácarés et al., 2007; Royer et al., 2016; Novo et al., 2017; Morimoto et al., 2018; Ube et al., 2019a). The study of mutants or engineered plants affected in phenolamide biosynthesis highlighted that phenolamides are an effective component of the plant defense strategy against pathogens. Indeed, potato plants with silenced transcription factors *StNAC43*, *StMYB8*, and *StWRKY1* accumulated less phenolamides and were more susceptible to *Phytophthora infestans* (Yogendra et al., 2015, 2017). An increased susceptibility to *Alternaria brassicicola* was also observed in Arabidopsis mutant *Atact*, which were depleted in *p*-coumaroylagmatine (Muroi et al., 2009). In contrast, overexpression of endogenous Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase (THT) in tomato increased accumulation of tyramine and octopamine derivatives and its resistance to *Pseudomonas syringae* (Campos et al., 2014), whereas the ectopic expression of the Arabidopsis Agmatine coumaroyl transferase (*AtACT*) in torenia plants rendered them more resistant to *Botrytis cinerea* (Muroi et al., 2012). Potato plants overexpressing both *AtACT* and the Arabidopsis DETOXIFICATION18 (*AtDTX18*) gene gained the capacity to synthesize *p*-coumaroylagmatine and export it to the leaf surface. Interestingly, the enhanced accumulation of *p*-coumaroylagmatine, *p*-coumaroyl-, and caffeoylputrescine on the potato leaf surface reduced spore germination of *P. infestans* (Dobritzsch et al., 2016).

The protective role of phenolamides against microbes involves at least two processes: direct antimicrobial activity and reinforcement of the secondary cell wall. Their antimicrobial activity has been demonstrated against bacteria and fungi, mostly through *in vitro* assays. Tyramine- and tryptamine-based phenolamides exhibit growth inhibition activity against *Xanthomonas* sp. (Newman et al., 2001; Morimoto et al., 2018), whereas *p*-coumaroylnoradrenaline together with *p*-coumaroyldopamine and feruloyldopamine are particularly effective in inhibiting the growth of *P. syringae* (Roepenack-Lahaye et al., 2003; Zácarés et al., 2007). Regarding antifungal activities, hordatines (hydroxycinnamoylagmatine dimers) were shown to inhibit the spore germination of 6 fungi, including *Bipolaris sorokiniana* and *Botrytis allii*, at low concentrations (as low as  $10^{-5}$  M) (Stoessl and Unwin, 1970). Two agmatine-based phenolamides from barley, murinamides A and B, were recently characterized for their capacity to inhibit spore germination and germ tube elongation of *B.*

*sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, and *A. brassicicola* (Ube et al., 2017). An antifungal effect impacting both spore germination and hyphal elongation was also demonstrated for *p*-coumaroylagmatine on *A. brassicicola* (Muroi et al., 2009). More recently, several phenolamides arising from tryptamine, serotonin, and tyramine were described to inhibit the conidial germination of the pathogenic fungus *Cochliobolus miyabeanus* (Morimoto et al., 2018). Phenolamides also contribute to reinforce the secondary cell wall upon pathogen infection, commonly named suberization. Indeed, involvement of tyramine associated phenolamides in the suberization process was demonstrated decades ago by a set of studies combining <sup>14</sup>C labelling and substructure cell fractionation on wounded or fungus-infected potato leaves and cell cultures (Negrel and Jeandet, 1987; Schmidt et al., 1998). Phenolamide integration in the cell wall was also reported in fungal-infected barley (*p*-coumaroylhydroxyagmatine), in chitin-elicited oat (avenanthramide), in virus-infected tobacco (feruloylputrescine and feruloyltryptamine), and fungus-infected potato plants (Torrigiani et al., 1997; Yogendra and Kushalappa, 2016). Incorporation to the secondary cell wall appears as a multistep process involving phenolamide dimerization or polymerization, which could necessitate peroxidase activity, followed by integration to the cell wall (King and Calhoun, 2005). The consequence of phenolamide incorporation to the cell wall is the reduction of its digestibility by pathogen hydrolytic enzymes, preventing pathogen proliferation.

### 1.2.2. Insects

Phenolamide induction in response to insects has already been reported in a diversity of plants, including Solanaceae and Poaceae, by different herbivore feeding guilds, including both chewing and sucking insects (Pearce et al., 1998; Kaur et al., 2010; Alamgir et al., 2016). Among the accumulated phenolamides, putrescine and spermidine derivatives are the most frequently reported. The accumulation of tyramine derivatives was also observed in maize infested by the chewing larvae of *Spodoptera littoralis* (Marti et al., 2013).

The involvement of phenolamides in plant defense against insects is supported by various studies. In *Nicotiana attenuata*, silencing of *NaMYB8* led to plants depleted in caffeoyl putrescine and dicaffeoylspermidine, on which both specialist and generalist caterpillars (*Manduca sexta* and *S. littoralis*, respectively) performed better (Kaur et al., 2010). In addition, spraying caffeoyl putrescine on leaves of silenced *NaMYB8* plants reduced the mass gain of *M. sexta* larva (Kaur et al., 2010). Moreover, the addition of phenolamides to the artificial diet of *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* increased their mortality (Alamgir et al., 2016). Phenolamide can also act as an oviposition decreasing factor. Sweet pepper tissues accumulating caffeoylputrescine showed ovipositional deterrence of *Liriomyza trifolii* leafminer, and cotyledon treatment with synthetic *p*-coumaroylputrescine also decreased oviposition (Tebayashi et al., 2007). Nevertheless, the induction of phenolamide accumulation upon herbivory is not always related to enhanced plant protection. In rice, the accumulation of *p*-coumaroyl- and feruloylputrescine appeared to have no impact on the performance of chewing insects *Spodoptera mauritia* and *Parnara guttata* (Alamgir et al., 2016). Moreover, in maize, the induced accumulation of *p*-coumaroyltyramine in response to *S. littoralis* herbivory appeared to benefit larvae development. Indeed, *in vitro* observations

showed that *p*-coumaroyltyramine present in the diet is beneficial for larval growth (Marti et al., 2013). In *N. attenuata*, the accumulation of the mixture of phenolamides upon attacks suggested that various phenolamides are required to maximize defense efficiency (Onkokesung et al., 2012).

### 1.3. Protective role against abiotic stress

Studies on phenolamides related to abiotic stress are rarer and less detailed than those related to biotic stress. Phenolamide accumulation has been reported in several plants in response to a large range of abiotic stress. Mineral deficiencies (K, Ca, Mg, P, S, and Cu), high temperatures, water excess, and exposure to UV-B and short-term acute O<sub>3</sub> levels induced putrescine and spermidine derivative accumulation in wheat, as well as in tobacco plant and cell cultures (Klapheck, 1983; Edreva et al., 1995; Edreva et al., 1998; Königshofer and Lechner, 2002; Demkura et al., 2010). Wounding induced the accumulation of tyramine, octopamine, and putrescine derivatives in potato and tomato plants (Negrel et al., 1996; Pearce et al., 1998; Matsuda et al., 2005).

A few studies demonstrated the negative impact of abiotic factors on phenolamide accumulation. This is the case with salt stress and nitrogen limitation (Shevyakova et al., 2006; Larbat et al., 2014). In the latter case, since nitrogen limitation promotes an increase in the concentration of phenolic compounds, the impact on phenolamide accumulation may be the consequence of a down-regulation in phenolamide specific acyltransferases or of a decrease in polyamine concentration.

Recently long-term disturbance of abiotic factors involved in climate change (elevation of CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> concentrations and temperature) have been evaluated on constitutive and pathogen-induced leaf specialized metabolites in barley. Plants grown under high temperature conditions (+5°C) accumulated more hordatine in non-infected leaves, but also more agmatine derivatives after pathogen infection. The impact of abiotic factors was, however, very specific to phenolamides (Mikkelsen et al., 2015).

The exact role of phenolamide accumulation on plant adaptation to abiotic stress is still a matter of hypotheses that need to be validated. One of them is that phenolamides contribute to limit the oxidative burst mediated by various abiotic stressors. Phenolamides are effective free radical scavengers and antioxidants (Langebartels et al., 1991; Edreva et al., 1998; Choi et al. 2007; Georgiev et al. 2012; Abe et al., 2017). Regarding the increase of phenolamides under UV treatment and the phenotype of *N. attenuata* lacking phenolamides under UV, it seems that they may also be involved in plant protection against solar UV. The mechanism of action still needs to be determined, but the role in UV absorbance may be postulated.

## 2. Regulatory aspects

Regulatory mechanisms underlying phenolamide accumulation in response to biotic stress have been highlighted recently (Fig. 3). Regarding microbial infection, a first report on tomato defense response to *P. syringae*, demonstrated, through the use of signaling mutants and phytohormone inhibitors, that phenolamide accumulation was dependent on ethylene (ET) but not salicylic acid (SA) (Zacarés et al., 2007). The ethylene pathway, together with the jasmonate (JA) pathway, is involved in phenolamide accumulation induced by

necrotrophic fungi *A. brassicicola* and *B. cinerea* in *A. thaliana* (Muroi et al., 2009; Li et al., 2018). Indeed, both phytohormones synergistically induce the expression of *AtACT* (Fig. 3). This induction is mediated by the transcription factor *AtORA59*, which is conformed as a homodimer, and when associated with the regulator MEDIATOR 25, can bind the *AtACT* promoter and induce its expression (Li et al., 2018). Interestingly, *AtACT* induction is also associated with the expression of *DTX18*, a Multidrug And Toxin Extrusion (MATE) transporter initially found to export *p*-coumaroylagmatine on the surface of *Arabidopsis* leaves when challenged with the non-hosted fungus *P. infestans*, the causal agent of the late blight in potato (Dobritzsch et al., 2016). An exhaustive analysis of the potato defense response in resistant and sensible cultivars infested with *P. infestans* led to the identification of at least two complementary pathways regulating the accumulation of phenolamides that occur in resistant cultivars (Yogendra et al., 2015, 2017). A first pathway is initiated by ET and involves a cascade of transcription factor regulation, including *StERF3*, which activates the transcription of *StNAC43* that, in turn, activates *StMYB8* expression (Fig. 3). *StMYB8* is a transcription factor that positively regulates the expression of a subset of genes involved in the phenylpropanoid pathway. Among them, hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase (HCT) and putrescine N-hydroxycinnamoyl transferase (PHT) are related to the metabolism of phenolamides, and others are related to the accumulation of flavonoids. Interestingly, silencing of either *StNAC43* or *StMYB8* impairs the accumulation of phenolamides and flavonoids and reduces the potatoes' resistance to *P. infestans* (Yogendra et al., 2017). A second pathway involves the transcription factor *StWRKY1* (Fig. 3). *StWRKY1* activity could be regulated at the transcription level, since binding sites to Heat Shock Protein (HSP) have been found in its promoter, or at the protein level through phosphorylation by *StMEK1*, a MAP kinase, which could enable the migration of *StWRKY1* into the nucleus (Yogendra et al., 2015). Interestingly, the two regulation pathways highlighted in potato appear to control different phenolamide subsets; the former one being more focused on putrescine and agmatine derivatives and the latter one involving tyramine and octopamine derivatives (Yogendra et al., 2015, 2017). In wheat, another WRKY transcription factor, *TaWRKY70*, is involved in the accumulation of *p*-coumaroylagmatine and *p*-coumaroylputrescine in response to infection with *F. graminearum* (Kage et al., 2017).

The mechanisms regulating the accumulation of caffeoylputrescine and mono- and dicaffeoylspermidine in response to herbivory have been extensively studied on the solanaceous model *N. attenuata*. The accumulation of phenolamides, together with nicotine and trypsin protease inhibitor accumulations, constitutes the main response of this plant to herbivory attacks (Gaquerel et al., 2014). Cumulative data including studies on mutants and transformants impaired in jasmonate biosynthesis and signaling, demonstrated that herbivore-induced phenolamide accumulation is mediated by the JA pathway and identified major steps of this pathway (Halitschke and Baldwin, 2003; Paschold et al., 2007; Stitz et al., 2011) (Fig. 3). Downstream of the JA pathway, the transcription factor *NaMYB8* appears as a master regulator, positively controlling the expression level of genes involved in the phenylpropanoid pathway (PAL, C4H) and genes encoding transferases (*NaAT1*, *NaDH29*, *NaCV86*) that catalyze the final steps of caffeoylputrescine and dicaffeoylspermidine synthesis (Kaur et al., 2010; Onkokesung et al., 2012). This classical JA-mediated response to

herbivores can be modulated by a huge number of regulatory processes. Among them, phytohormone crosstalk constitutes a major regulator. Indeed, herbivory was proven to induce bursts of several phytohormones, such as SA and cytokinin (CYT), in addition to JA (Fig. 3). SA and JA are well known antagonist phytohormones that promote the defense response to pathogens and herbivores, respectively. In response to herbivores, the antagonistic impact of SA on JA can be negated by regulatory proteins, including NPR1 (Rayapuram and Baldwin, 2007). CYT appears as a positive modulator of the JA-dependent response to herbivores since *N. attenuata* plants affected by CYT perception develop a lower phenolamide accumulation in response to herbivores (Schäfer et al., 2015). Interestingly, CYT and the auxin indole acetic acid (IAA) are important for constitutive phenolamide response to herbivores (Schäfer et al., 2015), whereas ET was recently proved as an attenuator of locally-induced phenolamide accumulation (Fagin et al., 2020). In rice, the auxin homolog 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) stimulates the JA-dependent response to herbivores (Xin et al., 2012).

Phenolamide induction in response to herbivores is also modulated by small RNAs. In the case of *N. attenuata*, the small RNA machinery involves the proteins RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1), Dicer-like DCL3 and DCL4, and Argonaute 8 (AGO8) (Pandey and Baldwin, 2007; Bozorov et al., 2012; Pradhan et al., 2017). The mechanisms by which this complex modulates herbivore-induced phenolamide accumulation are still unclear. Interestingly, the herbivore-induced phenolamide response is also modulated by abiotic stress, such as UV-B, which also stimulate the JA pathway (Demkura et al., 2010).

Behind the extensive knowledge acquired on the model plant *N. attenuata*, mechanistic insights on herbivore-induced phenolamides are much more limited. In *N. tabacum* cell cultures, phenolamide response to Methyl-Jasmonate (MeJA) treatment is mediated by the transcription factor *NtMYBJS1*, a close *NaMYB8* ortholog (Gális et al., 2006). Caffeoylputrescine content in pepper plants was increased by spraying leaves with MeJA (Tebayashi et al., 2007), and phenolamide accumulation was impaired in tomato mutants *jai1* affected in JA perception (Chen et al., 2006). In rice, the addition of JA to seedling culture medium, increase the concentration of a wide diversity of phenolamides (Morimoto et al., 2018). However, the mutant *Osjar1*, deficient in JA-Ileu, was only partially affected for herbivore-induced phenolamide accumulation, suggesting an alternative regulating pathway (Tanabe et al., 2016). Further studies are needed to elucidate the regulation steps involved in diverse plant families inducing phenolamide synthesis in response to herbivores.

### 3. Origin and evolution of phenolamide metabolism

The synthesis of phenolamides involves N-hydroxycinnamoyltransferase at the entry point of the pathway, which uses preexisting precursors as substrates derived from amine and phenylpropanoid metabolism (Fig. 1). These enzymes, specific to higher plants, catalyze the transfer of an activated hydroxycinnamoyl moiety, i.e hydroxycinnamoyl-CoA, to the amino group of an acceptor. N-hydroxycinnamoyltransferase acyl acceptor specificity is restricted to a single amine or a few related amines among polyamines (putrescine, spermidine, spermine, agmatine) or aromatic amines (tyramine, dopamine, tryptamine, serotonin, anthranilates) (Fig. 1). Besides, each N-hydroxycinnamoyltransferase uses, with various efficiency, a broad

range of hydroxycinnamoyl and related moieties (eg. *p*-coumaroyl, caffeoyl, feruloyl, benzoyl), leading to a large diversity of acyl decorations on amines. Consequently, N-hydroxycinnamoyltransferase acyl donor affinity mainly defines the final product decoration, also based on the pool of endogenous hydroxycinnamic acids available.

Since the first N-hydroxycinnamoyltransferases were isolated in tobacco in 1984, a great diversity of enzymes were discovered in terms of substrate specificity (mainly amine acceptor preference), category and number of amino group acylated on acceptors (primary/secondary amino groups, mono/poly acylation), distribution within plants (constitutive expression in various organs or induction), and distribution among species. This diversity is detailed in Table 1, which summarizes the main features of the 43 N-hydroxycinnamoyltransferases isolated and biochemically characterized to date. The diversity among N-hydroxycinnamoyltransferase seems to originate from active and recent evolution mechanisms, which are, in turn, responsible for the large variety of phenolamide structures and functions, as illustrated in previous parts of the review. The elucidation of the N-hydroxycinnamoyltransferase phylogeny and evolutionary origins is important to take a step forward in knowledge on phenolamides and might facilitate further studies on enzyme identification, phenolamide distribution among plant species, and identification of universal functions. Therefore, rather than describing every characterized N-hydroxycinnamoyltransferase (Table 1), we chose to examine the phylogeny of the enzymes in this part of the review.

N-hydroxycinnamoyltransferases originate from two distinct acyltransferase families. Most of them are classified within the plant-specific BAHD acyltransferases superfamily, whereas few are homologs to the GNAT (Gen5-related N-acetyltransferases) acyltransferase superfamily (Fig. 4). BAHD acyltransferases constitute a plant-specific group of acyltransferases, catalyzing O-acylation or N-acylation in an acyl-CoA dependent manner for a large diversity of acceptors. This family is named after the four enzymes that were first characterized (BEAT, ACT, HCBT, DAT). BAHD acyltransferases are mainly involved in the metabolism of flavonoids, alkaloids, hydroxycinnamic esters, long-chain fatty acids, and phenolamides (D'Auria, 2006; Tuominen et al., 2011). Enzymes belonging to this superfamily share two consensus motifs, HxxxDG and DFGWG, involved in substrate binding and catalytic activity, respectively. This family is subdivided into eight distinct clades according to sequence similarity (Fig. 4) (D'Auria, 2006; Tuominen et al., 2011). However, members of these clades exhibit very high versatile catalytic specificities, and N-hydroxycinnamoyltransferase are diversely distributed within BAHD clades as illustrated in the phylogenetic tree of Figure 3. Contrastingly, the GNAT superfamily contains N-acetyltransferases found in all living organisms and is one of the largest enzyme families. These enzymes acylate the amino group of various molecules, such as aminoglycosides, histones, arylalkylamines, decarboxylated amino acid, or polyamines (Salah Ud-Din et al., 2016; Vetting et al., 2005). GNAT enzymes have highly divergent sequences but share a structural conformation, including five  $\beta$ -strand, three  $\alpha$ -helix, and a P-loop (Zhu et al. 2006). The GNAT superfamily is composed of 17 acyltransferase families involved in a large variety of functions. Among them, the DAT family, also called the SSAT family (Diamine N-

AcyLTransferase or Spermidine/Spermine N1-AcyLTransferase), is dedicated to polyamine acetylation in both animals and plants (Pegg, 2008; Lou et al., 2016), but few members in plants are able to catalyze hydroxycinnamoylation (Facchini et al., 2002).

Thus, according to the phylogeny, N-hydroxycinnamoyltransferases are distributed in nine different clusters (Fig. 4). Each cluster contains enzymes that share almost the same substrate specificities and catalytic properties. We chose to attribute as cluster names, the name of the first enzymes discovered (*StTHT*, *HvACT*, *AtACT1*, *DcHCBT*, *AsHHT1*, *NaDH29*, *AtSDT*, *Os12g27220*, and *AtSHT*). Clusters of BAHD N-hydroxycinnamoyltransferase probably emerged independently from canonical O-acyltransferases of the different clades, through duplication events and neo-functionalization. Slight mutations on a duplicated copy of the ancestral gene might affect the binding domain of the enzyme and lead to changes in substrate affinity and new compound synthesis. This metabolic diversification was then further maintained and expensed, depending on the positive attributes of the organism. This phenomenon has been suggested for the emergence of rosmarinic acid synthase (RAS) and spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT) in BAHD clade Vb from the ancestral HCT (Petersen et al., 2009; Elejalde-Palmett et al., 2015). The independent emergence of N-hydroxycinnamoyltransferase clusters results in a poorly conserved motif among enzymes between clusters and generates overlapping activities corresponding to convergent evolution phenomena (Peng et al., 2016). Finally, it can be assumed that the emergence of the 9 clusters occurs in a different timeline during evolution and leads to the complex distribution and synthesis regulation of phenolamides observed among plant species. To elucidate the profile of ancestral N-hydroxycinnamoyltransferase for each cluster and identify the ancestral species in which they emerged, putative orthologs among Tracheophyta belonging to every cluster were retrieved from databases and analyzed (Fig. 5 and Sup. Fig. 2).

### 3.1. Cluster *StTHT*

The first N-hydroxycinnamoyltransferase was described in tobacco leaves challenged with tobacco mosaic virus (Negrel and Martin, 1984). The enzyme uses tyramine as the preferred acceptor substrate and has been called Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase (THT). Thus far, THTs have been purified in several Solanaceae (Hohlfeld et al., 1995; Negrel and Javelle, 1997) and further cloned in tobacco, tomato, potato, and pepper, forming the *StTHT* cluster (Schmidt et al., 1998; Farmer et al., 1999; Roepenack-Lahaye et al., 2003; Kang et al., 2009). This cluster is the only one belonging to the GNAT superfamily (Fig. 4). THT probably emerged from DAT-like enzymes involved in polyamine acetylation, such as *AtNATA1* (Lou et al., 2016), and occurred in the common Solanales ancestral organism, as phylogeny analysis did not report orthologues outside this plant order (Fig. 5). Since emergence, further gene duplications occurred, leading to multiple isoforms (Farmer et al., 1999; Roepenack-Lahaye et al., 2003; Kang et al., 2009). All THTs characterized to date are able to use tyramine as an acceptor, which seems to be the original acyl acceptor of canonical THT but also use additional decarboxylated amino acid with slight divergence: octopamine for *StTHT*, *NtTHT10/30*, and *NtTHT4/11*; noradrenaline, dopamine, and octopamine for *StTHT1-3*, *StTHT7-1*, and *StTHT7-8*; and serotonin for *CaSHT* (Schmidt et al., 1998; Roepenack-Lahaye et al., 2003; Kang et al., 2009). Most THTs are characterized by their

expression inducibility upon several environmental challenges, such as *StTHT*, *NtTHT10/30*, *NtTHT4/11*, *StTHT1-3*, and *CaSHT*. This supports the possible role of tyramine, serotonin, octopamine, noradrenaline, and dopamine based phenolamides in plant defense against biotic and abiotic stress in Solanaceae (Schmidt et al., 1998; Farmer et al., 1999; Roepenack-Lahaye et al., 2003; Kang et al., 2009).

### 3.2. Cluster *HvACT*

Agmatine hydroxyCinnamoylTransferase from barley (*HvACT*) is one of the first four BAHDs characterized (Burhenne et al., 2003), establishing BAHD clade IV. This clade is only composed of N-hydroxycinnamoyltransferases (Fig. 4). Cluster *HvACT* was initially reported to have emerged and expanded in Monocotyledons (Tuominen et al., 2011; Peng et al., 2016). As a result, three additional ACT-like were found in barley and seven in rice. These enzymes use diverse amine acceptors. *OsAHT1* and *OsPHT3* are specific for agmatine like *HvACT*, whereas *HvTHT2*, *HvTHT7*, and *HvTHT8* are specific for tryptamine and *OsTHT1*, *OsTHT2*, *OsTBT1*, and *OsTBT2* acylate tryptamine, serotonin, and tyramine (Burhenne et al., 2003; Tanabe et al., 2016; Ube et al., 2019b; Peng et al., 2019). The ability of several ACT-like to use tyramine and serotonin as substrates underlines a convergent evolution for tyramine and serotonin derived phenolamide synthesis in both Monocotyledons and Solanaceae using BAHD or GNAT acyltransferases, respectively (Peng et al., 2016). However, both enzymes, usually called THTs, should not be confused. Finally, an additional diversification in ACT-like acceptors was observed in rice for *OsPHT* and *OsPHT3*, which acylates a single amino group of putrescine (Tanabe et al., 2016). ACT-like isoforms are differentially expressed. Some are constitutively expressed in roots, flowers, or seedlings, whereas others are inducible upon pathogen challenge given defensive or developmental roles, depending on the phenolamide produced (Burhenne et al., 2003; Tanabe et al., 2016; Peng et al., 2019; Ube et al., 2019b).

As previously described, ACT-like were initially thought to be restricted to Monocotyledons until the *OsPHT* ortholog *NaAT1* was identified in *N. attenuata* (Onkokesung et al., 2012). This explained the common reports of hydroxycinnamoyl putrescine accumulation in both Gramineae and Solanaceae under pathogen infection (Samborski and Rohringer, 1970; Klapheck, 1983; Torrigiani et al., 1997; Ogura et al., 2001; Pushpa et al., 2014; Burt et al., 2019), but also narrow conservation of the cluster *HvACT* in Eudicotyledons as argued by the distribution of putative orthologs among plants, as shown in Figure 5. However, compared to other BAHD clades, the absence of O-acyltransferases, in addition to N-hydroxycinnamoyltransferases, in clade IV leads to the application of a non-selective threshold in sequences retained in our identification of putative *HvACT* orthologues. Consequently, most obtained accessions might be false positives, and conclusions on a wide distribution of *HvACT* clusters outside Monocotyledons are speculative. Since putrescine based phenolamides were reported outside Solanaceae, among Eudicotyledons (Martintanguy et al., 1978; Negrel, 1989; Kyselka et al., 2018; Elejalde-Palmett et al., 2015), their synthesis could also involve *HvACT* orthologues or any other N-hydroxycinnamoyltransferase clusters, such as *NaDH29*, *AtSDT*, *Os12g27220*, or one that is still unidentified.

### 3.3. Cluster *AtACT1*

As mentioned above, agmatine-based phenolamides are widespread in monocotyledons. They involve members of the cluster *HvACT* for their synthesis. These compounds are also sporadically reported in Eudicotyledon species, including *Arabidopsis* or *Albizzia* (Ueda et al., 1997; Muroi et al., 2009). The acyltransferase *AtACT1*, involved in agmatine acylation in *Arabidopsis*, was isolated and belongs to clade Ia of BAHD. *AtACT1* is highly divergent from cluster *HvACT* and corresponds to a second cluster of agmatine-specific N-hydroxycinnamoyltransferase, which seems to be restricted to Brassicales (Fig. 5) (Muroi et al., 2009).

### 3.4. Clusters *DcHCBT* and *AsHHT1*

Avenanthramides are specific to a small number of plant species and have only been reported in carnation and oat. The N-hydroxycinnamoyltransferases catalyzing acylation of anthranilate in these species were identified as hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase (*DcHCBT*) and Hydroxycinnamoyl-CoA:Hydroxyanthranilate N- Hydroxycinnamoyl Transferases (*AsHHTs*), respectively. They both belong to the BAHD clade Vb (Fig. 4) (Yang et al., 1997, 2004). However, *DcHCBT* and *AsHHTs* are not closely related and form two very small clusters that probably appeared recently and independently (Fig. 4 and Fig. 5). Additional gene duplication occurred in oat, leading to six putative HHT isoforms, including the characterized *AsHHT1* and *AsHHT4* (Li et al., 2019). The expression of *DcHCBT* and *AsHHTs* are mainly induced after pathogen infection in accordance with the phytoalexin function of avenanthramides (Yang et al., 1997, 2004).

### 3.5. Clusters *NaDH29*, *AtSDT* and *Os12g27220*

Three distinct N-hydroxycinnamoyltransferase clusters, among the BAHD superfamily, decorate primary amino groups of linear polyamines (Fig. 4). The clusters *AtSDT* and *Os12g27220* belong to the BAHD clade Va and catalyze the acylation of spermidine on primary amino groups at both extremities, leading to di-hydroxycinnamoyl spermidine, whereas the cluster *NaDH29* belongs to clade IIIa and is only able to acylate a single primary amino group of spermidine or spermine, depending on the enzymes, leading to hydroxycinnamoyl spermidine (*NaDH29* and *NaCV86*) or hydroxycinnamoyl spermine (*SmSpmHT* and *SrSpmHT*). The three clusters may result from convergent evolution in distinct higher plants (Fig. 5); cluster *Os12g27220* is restricted to Poales (Dong et al., 2015), cluster *NaDH29* is restricted to Solanales (Onkokesung et al., 2012; Peng et al., 2019), and cluster *AtSDT* seems more widely distributed among Rosids (Luo et al., 2009). Therefore, mono- and di-hydroxycinnamoyl spermidines/spermines are reported in a lot of plants but seems to originate from multi-convergent evolution, highlighting the importance of these compounds in plants, although their functions are poorly understood. Expression profiles of enzymes between and within the three groups are not conserved but widely detected in various tissues, including seedlings, roots, leaves, flowers, fruits, and under herbivory attacks (Luo et al., 2009; Onkokesung et al., 2012; Dong et al., 2015; Peng et al., 2019).

### 3.6. Cluster AtSHT

A fourth cluster of N-hydroxycinnamoyltransferases uses polyamines, mainly spermidine, as an acyl acceptor (Fig. 4). Cluster AtSHT belongs to BAHD clade Vb. The remarkable feature of the members of this cluster, so called SHT, compared to other N-hydroxycinnamoyltransferases is their ability to catalyze acylation on secondary amino groups in addition to primary amino groups (Grienenberger et al., 2009). This particularity probably involves modification by an enzyme with linear polyamine conformation to allow access to the secondary amino group. Therefore, SHTs acylate every amino group of spermidine, leading to tri-hydroxycinnamoyl spermidine. Consequently, SHTs should not be confused with enzymes using spermidine as a substrate. Since the first characterization of AtSHT in *Arabidopsis* (Grienenberger et al., 2009), additional SHT-like enzymes have been successfully isolated in apple tree (*MdSHT*), chicory (*CiSHT1* and *CiSHT2*), and eggplant (*SmSHT1* and *SrSHT1*) (Elejalde-Palmett et al., 2015; Peng et al., 2016; Delporte et al., 2018). Further genomic studies have highlighted the important conservation of SHT as a single copy throughout core Eudicotyledons, and the absence of tri-hydroxycinnamoyl spermidine was only demonstrated in few Eudicotyledon orders, such as Gentianales, Malvales, Cucurbitales, or Fabales (Elejalde-Palmett et al., 2015). Therefore, the SHT cluster seems to be the most ubiquitous and widespread N-hydroxycinnamoyltransferase (Fig. 5). SHT probably appeared in ancestral core Eudicotyledons from gene duplication and neo-functionalization of HCT, a member of BAHD clade Vb involved in lignification of vascular plants (Besseau et al., 2007; Kriegshauser et al., 2020). In addition to spermidine, some SHTs use, to a lesser extent, putrescine as an acceptor, and a shift from spermidine to spermine was demonstrated in the Asteraceae leading to the synthesis of tetra-hydroxycinnamoyl spermine (Delporte et al., 2018). Interestingly, in the Asteraceae family, two copies of SHTs were identified, but this apparent functional redundancy was not addressed (Delporte et al., 2018). Finally, a second conserved trait of SHTs is their exclusive and restricted expression in tapetum cells of anthers (Grienenberger et al., 2009; Elejalde-Palmett et al., 2015), allowing accumulation of tri/tetra-hydroxycinnamoyl spermidine/spermine derivatives in the pollen cell wall of most core Eudicotyledons.

### 3.7 Toward a third type of N-hydroxycinnamoyltransferase derived from polyketide synthases?

Polyketide synthase (PKS) is a large family of multifunctional enzymes, restricted to bacteria, fungi, and plants. They catalyze sequential condensation of malonyl-CoA units on a starting CoA ester substrate such as acetyl-CoA, followed by polyketide scaffold rearrangement leading to natural products with high diversity and complex chemical structures (Shen 2003; Nivina et al., 2019). In plants, the chalcone synthase (CHS) is a particular PKS which uses hydroxycinnamoyl-CoA as a starting substrate and initiates flavonoid metabolic pathway. CHS-like PKSs catalyze Claisen condensation on a hydroxycinnamic moiety using three malonyl-CoA units, followed by a cyclisation (Austin et al., 2003; Dibyendu, 2015). Recently, the expression in yeast of a tomato genes cluster related to flavonoids reveals the ability of *S/CHS* to catalyze a C-N bond formation between *p*-coumaroyl-CoA and hydroxyanthranilate, in addition to the canonical Claisen condensation (C-C bond) for

flavonoid synthesis (Kong et al. 2020). The synthesis of *p*-coumaroyl hydroxyanthranilate by *S*/*CHS*, also reported for the *Arabidopsis* CHS, was 40-fold less efficient than its classical activity which may impair an active avenanthramide biosynthesis in tomato and *Arabidopsis*. However, this discovery rises the possibility of a punctual neofunctionalization of CHS-like PKSs leading to phenolamide emergence in some plant species. A screen for new activities of CHS and the related stilbene synthase (STS) with monoamines and aliphatic polyamines as substrates must be investigated in the future.

### **3.8 Cytochromes P450 and O-methyltransferases as additional drivers of phenolamide diversification**

Appearance of phenolamides in plants is directly linked to the emergence of new N-hydroxycinnamoyltransferases with novel catalytic properties. As already mentioned, N-hydroxycinnamoyltransferases are usually more selective on acyl acceptor than on acyl donor. Consequently, the hydroxylation and the methylation of the hydroxycinnamoyl groups may occur before their transfer to the amines. However, chemical diversification among biosynthetic pathways derived from phenylpropanoids is generally dictated by cytochromes P450 and O-methyltransferases (Vogt, 2010) and the phenolamide pathway does not appear as an exception. In wheat, CYP98A11 and CYP98A12 were reported for the first time to effectively hydroxylate *p*-coumaroyl tyramine *in vitro* (Morant et al., 2007). More recently, high substrate plasticity has been demonstrated for some members of the CYP98A family among terrestrial plants, some of them being able to hydroxylate *in vitro* the hydroxycinnamic moiety of phenolamides (Alber et al., 2019). The CYP98A family is widely distributed among terrestrial plants and mainly dedicated to catalyze the hydroxylation of the *p*-coumaroyl shikimate ester for the biosynthesis of monolignols (Alber and Ehling, 2012). However, in angiosperms, a second copy of CYP98A has also been reported with a wide range of substrates among phenolic compounds (Alber et al., 2019). This additional copy may be recruited to catalyze the decoration of new phenolic compounds such as phenolamides. Such a neofunctionalization has been demonstrated *in planta* for the CYP98A8 and CYP98A9 paralogs involved in the synthesis of tri-hydroxycinnamoyl spermidine in *Arabidopsis* stamens (Matsuno et al., 2009; Liu et al., 2016). CYP98A8 and CYP98A9 are Brassicaceae-specific duplicates of the ancestral CYP98A3 involved in the synthesis of monolignols in vascular tissues (Liu et al., 2016). Evolutionary driven change in tissue expression associated with substrate plasticity may have contributed to this metabolic diversification (Matsuno et al., 2009). CYP98A8 and CYP98A9 retain regiospecificity for 3'-hydroxylation, but CYP98A8 also evolved to acquire additional 5'-hydroxylation activity (Matsuno et al., 2009; Liu et al., 2016). Unlike the exclusive expression of CYP98A8 in tapetum cells, CYP98A9 is also expressed in many tissues, and corresponds to an unfixed functional copy of CYP98A involved in the metabolism of flavonoids (Matsuno et al., 2009; Liu et al., 2016). In addition to CYP98A8 and CYP98A9, the synthesis of tri-hydroxycinnamoyl spermidine in *Arabidopsis* involve the caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase 1 (*AtCCoAOMT1*) and the tapetum-specific methyltransferase 1 (*AtTSM1*), two divergent O-methyltransferases of the CCoAOMT family (Fellenberg et al., 2008, 2009, 2012). *AtCCoAOMT1* catalyzes the 3'-OH methylation of caffeoyl-CoA to

feruloyl-CoA in vascular tissue, as a critical step in phenylpropanoid metabolism for the synthesis of monolignol. *AtCCoAOMT1* probably retained the same activity / substrates in tapetum cells for methylation of hydroxycinnamoyl fractions prior to their transfer to spermidine (Fellenberg et al., 2009, 2012). In contrast, the expression of *AtTSM1* is strictly coordinated with SHT and CYP98A8 in the tapetum, and catalyzes the 5'-OH methylation of tri-5-OH-feruloyl spermidine, thus acting after the transfer of hydroxycinnamoyl groups to the spermidine (Fellenberg et al., 2008). Although both OMTs are required for the synthesis of tri-hydroxycinnamoyl spermidine, only TSM1 has evolved to directly use phenolamide as substrates. Remarkably, the co-emergence of TSM1 and CYP98A8 in the Brassicaceae is responsible for the accumulation of spermidine coupled to the sinapoyl group, which has not been reported to date in other Eudicotyledons. Indeed, SHTs are not able to use this bulky acyl donor as a substrate (Grienenberger et al., 2009). Finally, the metabolic intermediates leading to the tri-hydroxycinnamoyl spermidines biosynthesis is not well established. Whereas the 5'-methoxylation occurs unequivocally on hydroxycinnamoyl groups coupled to spermidine, the contradictory results on substrate forms used by CYP98A9 and CCoAOMT (amide and CoA ester respectively) keep open the involvement of 3'-methoxylation on hydroxycinnamoyl moieties before or after transfer to spermidine. Both hypotheses are possible since SHT efficiently uses *p*-coumaroyl-CoA and feruloyl-CoA as acyl donors. This example showing the gain of function of P450s and OMTs for the diversification of tri-hydroxycinnamoyl spermidine from duplicated ancestral genes implies that similar process may have occurred on other phenolamide biosynthetic branches. This may deserve our attention in the future.

### 3.9 Phenolamide glycosylation and transport

Glycosylated phenolamides have been detected in the seeds of rye, barley, corn, foxtail millet and maize (Luo et al., 2009; Pihlava, 2014; Pihlava et al., 2018; Li et al., 2018; Xiang et al., 2019), in tobacco leaves (Li et al., 2018) and in *Arabidopsis* and chicory flowers (Fellenberg et al., 2009; Handrick et al., 2010; Delporte et al., 2018). The enzymes catalyzing their glycosylation remain unknown. However, the glycosylated forms being often detected as minor compounds compared to the free phenolamides, it may involve unspecialised and large-substrate accepting UDP-glycosyltransferases.

As previously presented in this review, the incorporation of phenolamides into the cell wall (Clarke and McCaig, 1982; Negrel et al., 1996; McLusky et al., 1999; King and Calhoun, 2005; Ishihara et al., 2008) and their localization on the surface of the pollen grain (Grienenberger et al., 2009; Delporte et al., 2018) imply their transport in the apoplast. Several membrane transporters involved in the release of parietal precursors from tapetum for the formation of sporopollenin have been characterized as the ABC transporters ABCG26 / ABCG3 for the polyketide (Quilichini et al., 2014; lefèvre et al., 2018) or the NPF transporter FST1 for the flavonol glycosides (Grunewald et al., 2020), but the tri-hydroxycinnamoyl spermidine transporters have not been identified. Multi-drug and toxic compound extrusion transporters (MATEs) are the best candidates for the transport of phenolamide across the membrane, as recently exemplified by the leaf export of *p*-coumaroylagmatine through

DTX18 in *Arabidopsis* (Dobritsch et al., 2016), but alternatively, the involvement of secretory vesicle systems could not be excluded (Xu et al., 2014).

#### 4. Conclusion and remaining challenges

As highlighted in this review, knowledge about phenolamides has increased considerably over the last decade, particularly with respect to their structural diversity and the mechanisms underlying their biosynthesis. Connecting these two aspects, it appears obvious that challenges remain in understanding and discovering all enzymes enabling the biosynthesis of this great chemical diversity. Presently, no enzyme catalyzing the di-acylation of putrescine, agmatine, or cadaverine has been reported. In addition, the coupling of dihydrocaffeoyl moieties to spermine, which leads to the promising therapeutic kukoamines, is still not resolved at the enzymatic level. This raises the question of the emergence of other N-hydroxycinnamoyltransferase clusters or diversification of already described ones. Behind these evolutionary aspects, structure-function analyses are urgently needed to identify key amino acids controlling enzyme specificity. Yet, no representative crystal structure of the above-mentioned N-hydroxycinnamoyltransferase clusters is available and the only few attempts of *in silico* modeling and docking simulations were not experimentally confirmed by mutant analysis (Peng et al., 2016; 2019). Likewise, subcellular organization of these pathways has still to be elucidated. Albeit subcellular localization has been demonstrated for some enzymes (Delporte et al., 2018), micro-compartmentation of these pathways must not be excluded. Many proteins involved in the phenylpropanoid pathway are assembled in supramolecular complex called metabolons (Ralston and Yu, 2006; Laursen et al., 2015). Particularly, considering that multiple acylation steps can occur, it is tempting to suggest an organization in metabolons of certain of these enzymes with other actors of the phenylpropanoid pathway. Indeed, it is not clear whether the intermediates are kept within the active site of the enzymes to complete acylations or if the intermediates are channeled between enzymes. This will deserve further investigations. Moreover, since a large amount of phenolamide dimers are now being described, knowledge regarding their dimerization is still to be uncovered. In barley, peroxidases have been suggested to catalyze the dimerization of hydroxycinnamoylagmatine to hordatine (Negrel and Smith, 1984; Burhenne et al., 2003). However, neither the enzyme nor the gene has been characterized to date (Nomura et al., 2007). The implication of other enzyme families needs to be investigated. As mentioned above, the role of cytochromes P450, O-methyl-transferases and polyketide synthases in the phenolamide pathway may have heretofore been underestimated. All these questions highlight the need to include more plant models in phenolamide metabolism studies. One of them should be plants from the genus *Lycium*. In this solanaceous genus, more than 42 phenolamide structures have been reported, including kukoamines, dimers, and glycosylated forms (Qian et al., 2017), but nothing has been described at the enzymatic level, which offers

a fantastic playground for discovering new enzymes. Those compounds may have a role in plants, in terms of their defense. Therefore, the optimization of their biosynthesis in plant organs is one of the ways to favor the biological control of pests and diseases. Functional roles of phenolamides, in terms of therapeutic and human health beneficial aspects, need further investigation. Two reviews have been published this year on these questions (Wang et al., 2020; Roumani et al., 2020). Research efforts focused on the added value of consuming food products rich in phenolamides (oat, barley, eggplant, tomato, and pepper, among others) appear essential.

## **Acknowledgments**

We thank the Ministry of Interior and Municipalities; Habbouche City Council, Lebanon for the 3 year PhD grant attributed to MR during her period at the Agronomy and Environment laboratory (LAE).

## **Author Contributions**

MR, CR, RL, SB, and DG designed the study. All authors contributed to write the introduction and conclusion. DG wrote the section “reproductive role”. MR, CR, and RL wrote sections related to biotic and abiotic stress, and the regulatory aspects. SB wrote the section related to origins and evolution of phenolamide metabolism. The whole manuscript and different sections were revised and corrected by all authors. They read and approved the final version of the manuscript.

## **Funding**

The PhD grant of MR was attributed by the Ministry of the Interior and Municipalities, Habbouche City Council, Lebanon. The other authors were funded by INRAe (RL and CR), Université de Lille (DG), and Université de Tours (SB).

## References:

- Abe K, Matsuura H, Ukai M, Shimura H, Koshino H, Suzuki T. 2017. N-1, N-14-diferuloylspermine as an antioxidative phytochemical contained in leaves of *Cardamine fauriei*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 81, 1855–1860.
- Alamgir KM, Hojo Y, Christeller JT, Fukumoto K, Isshiki R, Shinya T, Baldwin IT, Galis I. 2016. Systematic analysis of rice (*Oryza sativa*) metabolic responses to herbivory. *Plant, Cell & Environment* 39, 453–466.
- Alber A.V., and Ehlting J. 2012. Chapter 4 - Cytochrome P450s in Lignin Biosynthesis. In Advances in Botanical Research, L. Jouanin, and C. Lapierre, eds. (Academic Press), pp. 113–143.
- Alber A.V., Renault H., Basilio- Lopes A., Bassard J.-E., Liu Z., Ullmann P., Lesot A., Bihel F., Schmitt M., Werck- Reichhart D., Ehlting J. 2019. Evolution of coumaroyl conjugate 3-hydroxylases in land plants: lignin biosynthesis and defense. *The Plant Journal*. 99, 924–936.
- Ariizumi T, Toriyama K. 2011. Genetic regulation of sporopollenin synthesis and pollen exine development. *Annual Review of Plant Biology* 62, 437–460.
- Austin, M.B. and Noel, J.P. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural Product Reports* 20, 79–110.
- Baker CJ, Whitaker BD, Roberts DP, Mock NM, Rice CP, Deahl KL, Aver'yanov AA. 2005. Induction of redox sensitive extracellular phenolics during plant-bacterial interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 66, 90-98.
- Bassard J-E, Ullmann P, Bernier F, Werck-Reichhart D. 2010. Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 71, 1808–1824.
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M. 2007. Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *The Plant Cell* 19, 148–162.
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140, 103–125.
- Bozorov TA, Pandey SP, Dinh ST, Kim S-G, Heinrich M, Gase K, Baldwin IT. 2012. DICER-like proteins and their role in plant-herbivore interactions in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Integrative Plant Biology* 54, 189–206.
- Burhenne K, Kristensen BK, Rasmussen SK. 2003. A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3.1.64). *Journal of Biological Chemistry* 278, 13919–13927.
- Burt AJ, Arnason JT, García-Lara S. 2019. Natural variation of hydroxycinnamic acid amides in maize landraces. *Journal of Cereal Science* 88, 145–149.

Cabanne F, Dalebroux MA, Martin- Tanguy J, Martin C. 1981. Hydroxycinnamic acid amides and ripening to flower of *Nicotiana tabacum* var. xanthi n.c. *Physiologia Plantarum* 53, 399–404.

Campos L, Lisón P, López-Gresa MP, Rodrigo I, Zácarés L, Conejero V, Bellés JM. 2014. Transgenic tomato plants overexpressing tyramine N-Hydroxycinnamoyltransferase exhibit elevated hydroxycinnamic acid amide levels and enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 1159–1169.

Chen H, Jones AD, Howe GA. 2006. Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters* 580, 2540–2546.

Choi SW, Lee SK, Kim EO, Oh JH, Yoon KS, Parris N, Hicks KB, Moreau RA. 2007. Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 3920–3925.

Clarke J.M., McCaig T.N. 1982. Excised-leafwater retention capabilities as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Canadian Journal of Plant Science* 62, 571–578.

D'Auria JC. 2006. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 331–340.

Delporte M, Bernard G, Legrand G, Hielscher B, Lanoue A, Molinié R, Rambaud C, Mathiron D, Besseau S, Linka N, Hilbert J-L, Gagneul D. 2018. A BAHD neofunctionalization promotes tetrahydroxycinnamoyl spermine accumulation in the pollen coats of the Asteraceae family. *Journal of Experimental Botany* 69, 5355–5371.

Demkura PV, Abdala G, Baldwin IT, Ballare CL. 2010. Jasmonate-dependent and -independent pathways mediate specific effects of solar ultraviolet B radiation on leaf phenolics and antiherbivore defense. *Plant Physiology* 152, 1084–1095.

Dibyendu D.M. 2015. A brief review on plant type III polyketide synthase an important group of enzyme of secondary metabolism. *Research Journal of Recent Sciences* 4, 138–147.

Ding X, Wang X, Li Q, Yu L, Song Q, Gai J, Yang S. 2019. Metabolomics studies on cytoplasmic male sterility during flower bud development in soybean. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2869.

Dobritsch M, Lübken T, Eschen-Lippold L, Gorzolka K, Blum E, Matern A, Marillonnet S, Böttcher C, Dräger B, Rosahl S. 2016. MATE transporter-dependent export of hydroxycinnamic acid amides. *The Plant Cell* 28, 583–596.

Dong X, Gao Y, Chen W, Wang W, Gong L, Liu X, Luo J. 2015. Spatiotemporal distribution of phenolamides and the genetics of natural variation of hydroxycinnamoyl spermidine in rice. *Molecular Plant* 8, 111–121.

Edreva A, Yordanov I, Kardjieva R, Hadjiiska E, Gesheva E. 1995. Expression of phenylamides in abiotic stress conditions. *Bulg. J. Plant Physiol.* 15–23.

Edreva A, Yordanov I, Kardjieva R, Gesheva E. 1998. Heat shock responses of bean plants: involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biologia Plantarum* 41, 185–191.

Edreva AM, Velikova VB, Tsonev TD. 2007. Phenylamides in plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 54, 287–301.

Elejalde-Palmett C, Bernonville D, Dugé T, Glevarec G, Pichon O, Papon N, Courdavault V, St-Pierre B, Giglioli-Guivarc'h N, Lanoue A, Besseau S. 2015. Characterization of a spermidine hydroxycinnamoyltransferase in *Malus domestica* highlights the evolutionary conservation of trihydroxycinnamoyl spermidines in pollen coat of core Eudicotyledons. *Journal of Experimental Botany* 66, 7271–7285.

Facchini PJ, Hagel J, Zulak KG. 2002. Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Canadian Journal of Botany* 80, 577–589.

Farmer MJ, Czernic P, Michael A, Negrel J. 1999. Identification and characterization of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco. *European Journal of Biochemistry* 263, 686–694.

Fellenberg C., Milkowski C., Hause B., Lange P.-R., Böttcher C., Schmidt J., and Vogt T. 2008. Tapetum-specific location of a cation-dependent O-methyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56, 132–145.

Fellenberg C, Böttcher C, Vogt T. 2009. Phenylpropanoid polyamine conjugate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* flower buds. *Phytochemistry* 70, 1392–1400.

Fellenberg C, Handrick V, Ziegler J, Vogt T. 2012. Polyamine homeostasis in wild type and phenolamide deficient *Arabidopsis thaliana* stamens. *Frontiers in Plant Science* 3, 180.

Fellenberg C, Vogt T. 2015. Evolutionarily conserved phenylpropanoid pattern on angiosperm pollen. *Trends in Plant Science* 20, 212–218.

Gális I, Šimek P, Narisawa T, Sasaki M, Horiguchi T, Fukuda H, Matsuoka K. 2006. A novel R2R3 MYB transcription factor *NtMYBJS1* is a methyl jasmonate-dependent regulator of phenylpropanoid-conjugate biosynthesis in tobacco. *The Plant Journal* 46, 573–592.

Gaquerel E, Kotkar H, Onkokesung N, Galis I, Baldwin IT. 2013. Silencing an N-acyltransferase-like involved in lignin biosynthesis in *Nicotiana attenuata* dramatically alters herbivory-induced phenolamide metabolism. *PLOS ONE* 8, e62336.

Gaquerel E, Gulati J, Baldwin IT. 2014. Revealing insect herbivory-induced phenolamide metabolism: from single genes to metabolic network plasticity analysis. *The Plant Journal* 79, 679–692.

Georgiev L, Chochkova M, Ivanova G, Najdenski H, Ninova M, Milkova T. 2012. Radical scavenging and antimicrobial activities of cinnamoyl amides of biogenic monoamines. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 89, 91.

Grienenerger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M. 2009. A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *The Plant Journal* 58, 246–259.

Guo D-P, Sun Y-Z, Chen Z-J. 2003. Involvement of polyamines in cytoplasmic male sterility of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*). *Plant Growth Regulation* 41, 33–40.

Grunewald S., Marillonnet S., Hause G., Haferkamp I., Neuhaus H.E., Veß A., Hollemann T., Vogt, T. 2020. The tapetal major facilitator NPF2.8 is required for accumulation of flavonol glycosides on the pollen surface in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 32, 1727–1748.

Halitschke R, Baldwin IT. 2003. Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*. *The Plant Journal* 36, 794–807.

Handrick V., Vogt T., Frolov, A. 2010. Profiling of hydroxycinnamic acid amides in *Arabidopsis thaliana* pollen by tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398, 2789–2801.

Hess MW. 1993. Cell-wall development in freeze-fixed pollen: Intine formation of *Ledebouria socialis* (Hyacinthaceae). *Planta* 189, 139–149.

Hohlfeld H, Schurmann W, Scheel D, Strack D. 1995. Partial purification and characterization of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:tyramine hydroxycinnamoyltransferase from cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Plant Physiology* 107, 545–552.

Ishihara A., Hashimoto Y., Tanaka C., Dubouzet J.G., Nakao T., Matsuda F., Nishioka T., Miyagawa H., Wakasa K. 2008. The tryptophan pathway is involved in the defense responses of rice against pathogenic infection via serotonin production. *The Plant Journal* 54, 481–495.

Kage U, Yogendra KN, Kushalappa AC. 2017. TaWRKY70 transcription factor in wheat QTL-2DL regulates downstream metabolite biosynthetic genes to resist *Fusarium graminearum* infection spread within spike. *Scientific Reports* 7, 1–14.

Kang K, Park S, Kim YS, Lee S, Back K. 2009. Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 27–34.

Kaur H, Heinzel N, Schoettner M, Baldwin IT, Galis I. 2010. R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* 152, 1731–1747.

King RR, Calhoun LA. 2005. Characterization of cross-linked hydroxycinnamic acid amides isolated from potato common scab lesions. *Phytochemistry* 66, 2468–2473.

Klapheck S. 1983. Polyamines and cinnamoyl-putrescines in normal and sulfur-starved suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 112, 275–279.

Kong D., Li S., Smolke C.D. 2020. Discovery of a previously unknown biosynthetic capacity of naringenin chalcone synthase by heterologous expression of a tomato gene cluster in yeast. *Science Advances*. 6, eabd1143.

Königshofer H, Lechner S. 2002. Are polyamines involved in the synthesis of heat-shock proteins in cell suspension cultures of tobacco and alfalfa in response to high-temperature stress? *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 51-59.

Kriegshauser L, Knosp S, Grienberger E, Gütle D, Sørensen I, Herrgott L, Zumsteg J, Rose J, Reski R, Werck-Reichhart D, Renault H 2020. Function of the hydroxycinnamoyl-coA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase is evolutionarily conserved in embryophytes. *bioRxiv*300285.

Kyselka J, Bleha R, Dragoun M, Bialasová K, Horáčková Š, Schätz M, Sluková M, Filip V, Synytsya A. 2018. Antifungal polyamides of hydroxycinnamic acids from sunflower bee pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 11018–11026.

Langebartels C, Kerner K, Leonardi S, Schraudner M, Trost M, Heller W, Sandermann H. 1991. Biochemical-plant responses to ozone: Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology* 95, 882–889.

Larbat R, Paris C, Le Bot J, Adamowicz S. 2014. Phenolic characterization and variability in leaves, stems and roots of Micro-Tom and patio tomatoes, in response to nitrogen limitation. *Plant Science* 224, 62–73.

Laursen T., Møller B.L., and Bassard J.-E. 2015. Plasticity of specialized metabolism as mediated by dynamic metabolons. *Trends in Plant Science* 20, 20–32

Lefèvre F., Fourneau J., Pottier M., Baijot A., Cornet T., Abadía J., Álvarez-Fernández A., Boutry, M. 2018. The *Nicotiana tabacum* ABC transporter *NtPDR3* secretes O-methylated coumarins in response to iron deficiency. *Journal of Experimental Botany* 69, 4419–4431.

Li, J., Zhang, K., Meng, Y., Hu, J., Ding, M., Bian, J., et al. 2018. Jasmonic acid/ethylene signaling coordinates hydroxycinnamic acid amides biosynthesis through ORA59 transcription factor. *The Plant Journal* 95, 444–457.

Li Z, Zhao C, Zhao X, Xia Y, Sun X, Xie W, Ye Y, Lu X, Xu G. 2018. Deep annotation of hydroxycinnamic acid amides in plants based on ultra-high-performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry and its *in silico* database. *Analytical Chemistry* 90, 14321–14330.

Li Z, Chen Y, Meesapyodsuk D, Qiu X. 2019. The biosynthetic pathway of major avenanthramides in oat. *Metabolites*. 8,163.

Liu Z., Tavares R., Forsythe E.S., André F., Lugan R., Jonasson G., Boutet-Mercey S., Tohge T., Beilstein M.A., Werck-Reichhart D., Renault H. 2016. Evolutionary interplay between sister cytochrome P450 genes shapes plasticity in plant metabolism. *Nature Communications* 7, 13026.

López-Gresa MP, Maltese F, Bellés JM, Conejero V, Kim HK, Choi YH, Verpoorte R. 2010. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochemical Analysis* 21, 89–94.

Lopez-Gresa MP, Lison P, Yenush L, Conejero V, Rodrigo I, Belles JM. 2016. Salicylic acid is involved in the basal resistance of tomato plants to *Citrus exocortis* viroid and tomato spotted wilt virus. *Plos One* 11, e0166938.

Lou Y-R, Bor M, Yan J, Preuss AS, Jander G. 2016. *Arabidopsis* NATA1 acetylates putrescine and decreases defense-related hydrogen peroxide accumulation. *Plant Physiology* 171 1443–1455.

Luo J, Fuell C, Parr A, Hill L, Bailey P, Elliott K, Fairhurst SA, Martin C, Michael AJ. 2009. A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in *arabidopsis* seed. *Plant Cell* 21, 318–333.

Macoy DM, Kim W-Y, Lee SY, Kim MG. 2015. Biotic stress related functions of hydroxycinnamic acid amide in plants. *Journal of Plant Biology* 58, 156–163.

McLusky S.R., Bennett M.H., Beale M.H., Lewis M.J., Gaskin P., Mansfield J.W. 1999. Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*. 17, 523–534.

Marti G, Erb M, Boccard J, Glauser G, Doyen GR, Villard N, Robert CAM, Turlings TCJ, Rudaz S, Wolfender J-L. 2013. Metabolomics reveals herbivore-induced metabolites of resistance and susceptibility in maize leaves and roots. *Plant, Cell & Environment* 36, 621–639.

Martin-Tanguy J, Cabanne F, Perdrizet E, Martin C. 1978. The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. *Phytochemistry* 17, 1927–1928.

Martin-Tanguy J. 1985. The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regulation* 3, 381–399.

Martin-Tanguy J. 1997. Conjugated polyamines and reproductive development: Biochemical, molecular and physiological approaches. *Physiol, Plant*, 675–688.

Matsuda F, Morino K, Ano R, Kuzawa M, Wakasa K, Miyagawa H. 2005. Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in elicitor-treated potato tuber tissue. *Plant and Cell Physiology* 46, 454–466.

Matsuno M, Compagnon V, Schoch GA, Schmitt M, Debayle D, Bassard J-E, Pollet B, Hehn A, Heintz D, Ullmann P, Lapierre C, Bernier F, Ehlting J, Werck-Reichhart D. 2009. Evolution of a novel phenolic pathway for pollen development. *Science* 325, 1688–1692.

Meurer B, Wiermann R, Strack D. 1988. Phenylpropanoid pattern in Fagales pollen and their phylogenetic relevance. *Phytochemistry* 27, 803–828.

Mikkelsen BL, Olsen CE, Lyngkjær MF. 2015. Accumulation of secondary metabolites in healthy and diseased barley, grown under future climate levels of CO<sub>2</sub>, ozone and temperature. *Phytochemistry* 118, 162–173.

Morant M., Schoch G.A., Ullmann P., Ertunç T., Little D., Olsen C.E., Petersen M., Negrel J., Werck-Reichhart D. 2007. Catalytic activity, duplication and evolution of the CYP98 cytochrome P450 family in wheat. *Plant Molecular Biology* 1, 1–19.

Morimoto N, Ueno K, Teraishi M, Okumoto Y, Mori N, Ishihara A. 2018. Induced phenylamide accumulation in response to pathogen infection and hormone treatment in rice (*Oryza sativa*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 82, 407–416.

Muroi A, Ishihara A, Tanaka C, Ishizuka A, Takabayashi J, Miyoshi H, Nishioka T. 2009. Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 230, 517–527.

Muroi A, Matsui K, Shimoda T, Kihara H, Ozawa R, Ishihara A, Nishihara M, Arimura G. 2012. Acquired immunity of transgenic torenia plants overexpressing agmatine coumaroyltransferase to pathogens and herbivore pests. *Scientific Reports* 2, 689.

Negrel J, Martin C. 1984. The biosynthesis of feruloyltyramine in *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 23, 2797–2801.

Negrel J, Jeandet P. 1987. Metabolism of tyramine and feruloyltyramine in TMV inoculated leaves of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 26, 2185–2190.

Negrel J. 1989. The biosynthesis of cinnamoylputrescines in callus tissue cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 28, 477–481.

Negrel J, Pollet B, Lapierre C. 1996. Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. *Phytochemistry* 43, 1195–1199.

Negrel J, Javelle F. 1997. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase from tobacco cell-suspension cultures. *European Journal of Biochemistry* 247, 1127–1135.

Newman MA, von Roepenack-Lahaye E, Parr A, Daniels MJ, Dow JM. 2001. Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by *hrp* gene-dependent and *hrp* gene-independent mechanisms. *Molecular plant-microbe interactions* 14, 785–792.

Nivina A., Yuet K.P., Hsu J., Khosla C. 2019. Evolution and Diversity of Assembly-Line Polyketide Synthases. *Chemical Reviews*. 119, 12524–12547.

Novo M, Silvar C, Merino F, Martinez-Cortes T, Lu F, Ralph J, Pomar F. 2017. Deciphering the role of the phenylpropanoid metabolism in the tolerance of *Capsicum annuum* L. to *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant Science* 258, 12–20.

Ogura Y, Ishihara A, Iwamura H. 2001. Induction of hydroxycinnamic acid amides and tryptophan by jasmonic acid, abscisic acid and osmotic stress in barley leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C* 56, 193–202.

Onkokesung N, Gaquerel E, Kotkar H, Kaur H, Baldwin IT, Galis I. 2012. MYB8 controls inducible phenolamide levels by activating three novel hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:polyamine transferases in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiology* 158, 389–407.

Pandey SP, Baldwin IT. 2007. RNA-directed RNA polymerase 1 (RdR1) mediates the resistance of *Nicotiana attenuata* to herbivore attack in nature. *The Plant Journal* 50, 40–53.

Paschold A, Halitschke R, Baldwin IT. 2007. Co(i)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore- induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. *The Plant Journal* 51, 79–91.

Pearce G, Marchand PA, Griswold J, Lewis NG, Ryan CA. 1998. Accumulation of feruloyltyramine and *p*-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. *Phytochemistry* 47, 659–664.

Pegg AE. 2008. Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(6), 995-1010.

Peng H, Yang T, Whitaker BD, Trout F, Shangguan L, Dong W, Jurick WM. 2016. Characterization of spermidine hydroxycinnamoyl transferases from eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relative *Solanum richardii* Dunal. *Horticulture Research* 3, 16062.

Peng, H., Meyer, R. S., Yang, T., Whitaker, B. D., Trout, F., Shangguan, L., Huang J., Litt, A., Little, D.P, Ke, H., Jurick W.M. 2019. A novel hydroxycinnamoyl transferase for synthesis of hydroxycinnamoyl spermine conjugates in plants. *BMC Plant Biol.* 19, 261.

Pihlava J.-M. 2014. Identification of hordatines and other phenolamides in barley (*Hordeum vulgare*) and beer by UPLC-QTOF-MS. *Journal of Cereal Science* 60, 645–652.

Pihlava J.-M., Hellström J., Kurtelius T., Mattila, P. 2018. Flavonoids, anthocyanins, phenolamides, benzoxazinoids, lignans and alkylresorcinols in rye (*Secale cereale*) and some rye products. *Journal of Cereal Science* 79, 183–192.

Pradhan M, Pandey P, Gase K, Sharaff M, Singh RK, Sethi A, Baldwin IT, Pandey SP. 2017. Argonaute 8 (AGO8) Mediates the elicitation of direct defenses against herbivory. *Plant Physiology* 175, 927–946.

Pushpa D, Yogendra KN, Gunnaiah R, Kushalappa AC, Murphy A. 2014. Identification of late blight resistance-related metabolites and genes in potato through nontargeted metabolomics. *Plant Molecular Biology Reporter* 32, 584–595.

Qian D., Zhao Y., Yang G., Huang L. 2017. Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus *Lycium* (Solanaceae). *Molecules* 22, 911.

Quilichini T.D., Samuels A.L., Douglas C.J. 2014. ABCG26-mediated polyketide trafficking and hydroxycinnamoyl spermidines contribute to pollen wall exine formation in *arabidopsis*. *Plant Cell* 26, 4483–4498.

Quilichini TD, Grienberger E, Douglas CJ. 2015. The biosynthesis, composition and assembly of the outer pollen wall: A tough case to crack. *Phytochemistry* 113, 170–182.

Ralston L., and Yu O. 2006. Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochemistry Reviews* 5, 459–472.

Rayapuram C, Baldwin IT. 2007. Increased SA in NPR1-silenced plants antagonizes JA and JA-dependent direct and indirect defenses in herbivore-attacked *Nicotiana attenuata* in nature. *The Plant Journal* 52, 700–715.

Roepenack-Lahaye E von, Newman M-A, Schornack S, Hammond-Kosack KE, Lahaye T, Jones JDG, Daniels MJ, Dow JM. 2003. *p*-Coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens. *Journal of Biological Chemistry* 278, 43373–3383.

Roumani M., Duval R.E., Ropars A., Risler A., Robin C., Larbat R. 2020. Phenolamides: Plant specialized metabolites with a wide range of promising pharmacological and health-promoting interests. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 131, 110762.

Royer M, Larbat R, Le Bot J, Adamowicz S, Nicot PC, Robin C. 2016. Tomato response traits to pathogenic *Pseudomonas* species: Does nitrogen limitation matter? *Plant Science* 244, 57–67.

Ryabinine AA, Ilina EM. 1949. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 513.

Salah Ud-Din AIM, Tikhomirova A, Roujeinikova A. 2016. Structure and functional diversity of GCN5-Related N-acetyltransferases (GNAT). *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1018.

Samborski DJ, Rohringer R. 1970. Abnormal metabolites of wheat: Occurrence, isolation and biogenesis of 2-hydroxyputrescine amides. *Phytochemistry* 9, 1939–1945.

Schäfer M, Meza- Canales ID, Brüting C, Baldwin IT, Meldau S. 2015. Cytokinin concentrations and Chase-Domain Containing His Kinase 2 (NaCHK2)- and NaCHK3-mediated perception modulate herbivory-induced defense signaling and defenses in *Nicotiana attenuata*. *New Phytologist* 207, 645–658.

Schmidt A, Scheel D, Strack D. 1998. Elicitor-stimulated biosynthesis of hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of *Solanum tuberosum*. *Planta* 205, 51–55.

Shevyakova NI, Rakitin VYu, Stetsenko LA, Aronova EE, Kuznetsov VV. 2006. Oxidative stress and fluctuations of free and conjugated polyamines in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. under NaCl salinity. *Plant Growth Regulation* 50, 69–78.

- Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology* 7, 285–295.
- Shi Z, Wei F, Wan R, Li Y, Wang Y, An W, Qin K, Dai G, Cao Y, Feng J. 2019. Impact of nitrogen fertilizer levels on metabolite profiling of the *Lycium barbarum* L. fruit. *Molecules* 24, 3879.
- Stitz M, Baldwin IT, Gaquerel E. 2011. Diverting the flux of the JA pathway in *Nicotiana attenuata* compromises the plant's defense metabolism and fitness in nature and glasshouse. *Plos One* 6, e25925.
- Stoessl A, Unwin CH. 1970. The antifungal factors in barley. V. Antifungal activity of the hordatines. *Canadian Journal of Botany* 48, 465–470.
- Tanabe K, Hojo Y, Shinya T, Galis I. 2016. Molecular evidence for biochemical diversification of phenolamide biosynthesis in rice plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 58, 903–913.
- Tebayashi S, Horibata Y, Mikagi E, Kashiwagi, T, Mekuria DB, Dekebo A, Ishihara A, Kim C-S. 2007. Induction of resistance against the leafminer, *Liriomyza trifolii*, by jasmonic acid in sweet pepper. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71, 1521–1526.
- Tiburcio AF, Kaur-Sawhney R, Galston AW. 1993. Spermidine biosynthesis as affected by osmotic stress in oat leaves. *Plant Growth Regulation* 13, 103–109.
- Torrigiani P, Rabiti AL, Bortolotti C, Betti L, Marani F, Canova A, Bagni N. 1997. Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist* 135, 467–473.
- Tuominen LK, Johnson VE, 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.
- Ube N, Nishizaka M, Ichiyanagi T, Ueno K, Taketa S, Ishihara A. 2017. Evolutionary changes in defensive specialized metabolism in the genus *Hordeum*. *Phytochemistry* 141, 1–10.
- Ube N, Harada D, Katsuyama Y, Osaki-Oka K, Tonooka T, Ueno K, Taketa S, Ishihara A. 2019a. Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry* 167, 112098.
- Ube N, Yabuta Y, Tohnooka T, Ueno K, Taketa S, Ishihara A. 2019b. Biosynthesis of phenylamide phytoalexins in pathogen-infected barley. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 5541.
- Ueda M, Tashiro C, Yamamura S. 1997. *cis*-*p*-coumaroylagmatine, the genuine leaf-opening substance of a nyctinastic plant, *Albizzia julibrissin* Durazz. *Tetrahedron Letters* 38, 3253–3256.

Vetting MW, S de Carvalho LP, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, Blanchard JS. 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* 433(1), 212-26.

Vogt T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3, 2–20.

Vogt T. 2018. Unusual spermine-conjugated hydroxycinnamic acids on pollen: function and evolutionary advantage. *Journal of Experimental Botany* 69, 5311–5315.

Wang W., Snooks H.D. Sang S. 2020. The Chemistry and Health Benefits of Dietary Phenolamides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 6248–6267.

Xiang J., Zhang M., Apea-Bah F.B., Beta T. 2019. Hydroxycinnamic acid amide (HCAA) derivatives, flavonoid C-glycosides, phenolic acids and antioxidant properties of foxtail millet. *Food Chemistry* 295, 214–223.

Xin Z, Yu Z, Erb M, Turlings TCJ, Wang B, Qi J, Liu S, Lou Y. 2012. The broad-leaf herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid turns rice into a living trap for a major insect pest and a parasitic wasp. *The New Phytologist* 194, 498–510.

Xu J., Ding Z., Vizcay-Barrena G., Shi J., Liang W., Yuan Z., Werck-Reichhart D., Schreiber L., Wilson Z.A., Zhang, D. 2014. Aborted Microspores acts as a master regulator of pollen wall formation in arabidopsis. *Plant Cell* 26, 1544–1556.

Yang Q, Reinhard K, Schiltz E, 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 Molecular Biology* 35, 777–789.

Yang Q, Trinh HX, Imai S, Ishihara A, Zhang L, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S. 2004. Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. *Molecular plant-microbe interactions. Molecular Plant-Microbe Interactions*. 17, 81–89.

Yogendra KN, Kumar A, Sarkar K, Li Y, Pushpa D, Mosa KA, Duggavathi R, Kushalappa AC. 2015. Transcription factor StWRKY1 regulates phenylpropanoid metabolites conferring late blight resistance in potato. *Journal of Experimental Botany* 66, 7377–7389.

Yogendra KN, Kushalappa AC. 2016. Integrated transcriptomics and metabolomics reveal induction of hierarchies of resistance genes in potato against late blight. *Functional Plant Biology* 43, 766–782.

Yogendra KN, Sarkar K, Kage U, Kushalappa AC. 2017. Potato NAC43 and MYB8 Mediated transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis to contain *Phytophthora infestans* infection. *Plant Molecular Biology Reporter* 35, 519–533.

Zacarés L, López-Gresa MP, Fayos J, Primo J, Bellés JM, Conejero V. 2007. Induction of *p*-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20, 1439–1448.

Zhang H, Liu R, Lu Q. 2020. Separation and Characterization of phenolamines and flavonoids from rape bee pollen, and comparison of their antioxidant activities and protective effects against oxidative stress. *Molecules* 25, 1264.

Zhu YQ, Zhu DY, Yin L, Zhang Y, Vonrhein C, Wang DC. 2006. Crystal structure of human spermidine/spermineN1-acetyltransferase (hSSAT): The first structure of a new sequence family of transferase homologous superfamily. *Proteins* 63, 1127–1131.

**Table 1:** Characterized N-hydroxycinnamoyltransferases involved in phenolamide biosynthesis.

Cluster name	Superfamily	Family or Clade	Enzyme name	Species	Expression profile	Substrats		Catalytic properties		Accession number	References
						Acceptors	CoA-ester donors	Type of amino group acylated	Number of substitution catalysed		
	GNAT	DAT	StHT	<i>Solanum tuberosum</i>	Induced by virus and phytopathogens, root	Tyramine, octopamine	Ci, Fe	1°	Mono	AB061243	Schmidt 1999
	GNAT	DAT	NtHT10/30	<i>Nicotiana tabacum</i>	Induced by phytopathogens	Tyramine, octopamine	Fe	1°	Mono	AJ005062	Farmer et al. 1999
StHT	GNAT	DAT	NtHT4/11	<i>Nicotiana tabacum</i>	Induced by phytopathogens	Tyramine, octopamine	Fe	1°	Mono	AJ131767	Farmer et al. 1999
	GNAT	DAT	SHT1-3	<i>Solanum lycopersicum</i>	Leaf, induced by phytopathogens	Tyramine, noradrenaline, dopamine, octopamine	pC	1°	Mono	AY081905	Von roepenack-lahaye et al. 2003

GNAT	DAT	SITHT7-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Leaf	Tyramine, noradrenaline, dopamine, octopamine	pC	1°	Mono	AY081906	Von roepenack-lahaye et al. 2003	
GNAT	DAT	SITHT7-8	<i>Solanum lycopersicum</i>	Leaf	Tyramine, noradrenaline, dopamine, octopamine	pC	1°	Mono	AY081907	Von roepenack-lahaye et al. 2003	
GNAT	DAT	CaTHT	<i>Capsicum annuum</i>	Stem, root	Tyramine	Fe, pC	1°	Mono	AY819700	Kang et al. 2006	
GNAT	DAT	CaSHT	<i>Capsicum annuum</i>	Flower, stem, UV-induced	Serotonin, tyramine	Caf, Fe, pC	1°	Mono	AF329463	Back et al. 2001, Kang et al. 2006	
BAHD	IV	HvACT	<i>Hordeum vulgare</i>	Seedling, induced by phytopathogens	Agmatine	Ci, pC, Fe, Caf	1°	Mono	AY228552	Burhenne et al. 2003	
BAHD	IV	HvTHT7	<i>Hordeum vulgare</i>	Induced by phytopathogens	Tryptamine, serotonin	Ci, Fe, pC	1°	Mono	Hr1G0194 10.1	Ube et al. 2019	
BAHD	IV	HvTHT8	<i>Hordeum vulgare</i>	Induced by phytopathogens	Tryptamine, serotonin	Ci, Fe, pC	1°	Mono	Hr1G0777 80.1	Ube et al. 2019	
HvACT	BAHD	IV	HvTHT2	<i>Hordeum vulgare</i>	Induced by phytopathogens	Tryptamine, serotonin, tyramine	Fe	1°	Mono	Hr1G0777 90.1	Ube et al. 2019
BAHD	IV	OsAHT1	<i>Oryza sativa</i>	Root, flower	Agmatine	Fe	1°	Mono	BAS91492	Tanabe et al. 2016	
BAHD	IV	OsPHT3	<i>Oryza sativa</i>	Root, flower	Agmatine, putrescine	pC, Fe	1°	Mono	BAT09225	Tanabe et al. 2016	
BAHD	IV	OsPHT	<i>Oryza sativa</i>	Root, flower, wounding	Putrescine	Fe, pC	1°	Mono	BAT09226	Tanabe et al. 2016	

	BAHD	IV	OsTHT1	<i>Oryza sativa</i>	nd	Tryptamine, serotonin, tyramine	pC, Caf, Bz	1°	Mono	Os10g233 10	Peng et al. 2016a
	BAHD	IV	OsTHT2	<i>Oryza sativa</i>	nd	Tryptamine, serotonin, tyramine	pC, Caf, Fe	1°	Mono	Os10g238 20	Peng et al. 2016a
	BAHD	IV	OsTBT1	<i>Oryza sativa</i>	nd	Tryptamine, serotonin, tyramine	pC, Bz, Caf	1°	Mono	Os11g422 90	Peng et al. 2016a
	BAHD	IV	OsTBT2	<i>Oryza sativa</i>	nd	Tryptamine, serotonin, tyramine	Bz	1°	Mono	Os11g423 70	Peng et al. 2016a
	BAHD	IV	NaAT1	<i>Nicotiana attenuata</i>	Induced by herbivore attack	Putrescine	Caf, Fe	1°	Mono	JN390826	Onkokesung et al. 2012
AtACT1	BAHD	Ia	AtACT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Induced by phytopathogens	Agmatine	pC, Fe	1°	Mono	BT011800	Muroi et al. 2009
	BAHD	IIIa	NaCV86	<i>Nicotiana attenuata</i>	Induced by herbivore attack	Acylated spermidine	pC, Caf	1°	Mono	JN390825	Onkokesung et al. 2012
NaDH29	BAHD	IIIa	NaDH29	<i>Nicotiana attenuata</i>	Induced by herbivore attack	Spermidine	Caf, Fe, pC	1°	Mono	JN390824	Onkokesung et al. 2012
	BAHD	IIIa	SmSpmHT	<i>Solanum melangena</i>	nd	Spermine	pC	1°	Mono	KP233218	Peng et al. 2019
	BAHD	IIIa	SrSpmHT	<i>Solanum richardii</i>	Fruit	Spermine	pC, Fe, Caf	1°	Mono	KR150683	Peng et al. 2019
AtSDT	BAHD	Va	AtSCT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Root	Spermidine	pC	1°	Di	NM12807 2	Luo et al. 2009
	BAHD	Va	AtSDT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Silique, seedling	Spermidine	S	1°	Di	NM12791 5	Luo et al. 2009
Os12g27	BAHD	Va	Os12g27	<i>Oryza sativa</i>	Leaf	Spermidine	pC, Fe	1°	Di	ABA98379	Dong et al. 2015

220	220			e							
	BAHD	Va	Os12g27 254	<i>Oryza sativa</i>	Various tissues	Spermidine	pC, Fe	1°	Di	ABG22016	Dong et al. 2015
AtSHT	BAHD	Vb	AtSHT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tapetum	Spermidine	Fe, Caf, pC, Ci	1° and 2°	Tri	NM12746	Grienenerger et al. 2009
	BAHD	Vb	MdSHT	<i>Malus domestica</i>	Anther	Spermidine	pC, Fe, Caf	1° and 2°	Tri	ALF00095	Elejalde-palmett et al. 2015
	BAHD	Vb	NtSHT	<i>Nicotiana tabacum</i>	nd	Spermidine	pC, Fe, Caf	1° and 2°	Tri	MN78704	Personal communication
	BAHD	Vb	SISHT	<i>Solanum lycopersicum</i>	nd	Spermidine	Fe, pC, Caf	1° and 2°	Tri	MN78704	Personal communication
	BAHD	Vb	RicSHT	<i>Ricinus communis</i>	nd	Spermidine	Fe, Caf	1° and 2°	Tri	MN78704	Personal communication
	BAHD	Vb	VvSHT	<i>Vitis vinifera</i>	nd	Spermidine	Fe, pC	1° and 2°	Tri	MN78704	Personal communication
	BAHD	Vb	RocSHT	<i>Rosa canina</i>	nd	Spermidine	pC, Fe	1° and 2°	Tri	MN78704	Personal communication
	BAHD	Vb	SmSHT1	<i>Solanum melangena</i>	Flower, fruit, induced by abiotic stress	Spermidine, spermine	Caf, Fe, pC	1° and 2°	Tri	KP165410	Peng et al. 2016b
	BAHD	Vb	SrSHT1	<i>Solanum richardii</i>	nd	Spermidine, spermine	Caf, Fe, pC	1° and 2°	Tri	KP165411	Peng et al. 2016b
	BAHD	Vb	CiSHT1	<i>Cichorium intybus</i>	Flower	Spermine, spermidine	pC, Caf, Fe, Ci	1° and 2°	Tetra	MG45724 3	Delporte et al. 2018
DcHCBT	BAHD	Vb	CiSHT2	<i>Cichorium intybus</i>	Flower	Spermine, spermidine	pC, Caf, Fe, Ci	1° and 2°	Tetra	MG45724 4	Delporte et al. 2018
	BAHD	Vb	DcHCBT	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Induced by phytopathogens	Anthranilate	Ci, pC, Bz	1°	Mono	Z84383	Yang et al. 1997
AsHHT1	BAHD	Vb	AshHT1	<i>Avena sativa</i>	Induced by phytopathogens	5OH-anthranilate	pC, Caf	1°	Mono	AB076980	Yang et al. 2004; Li et al. 2019

---

BAHD	Vb	AshHT4	<i>Avena sativa</i>	Leaf	5OH-anthranilate	pC, Caf	1°	Mono	MH39706	Yang et al. 2004; Li et al. 2019
------	----	--------	---------------------	------	------------------	---------	----	------	---------	----------------------------------

---

Acceptor and donor substrates are listed in range of efficiency. Ci, cinnamoyl; pC, p-coumaroyl; Caf, cafferooyl; Fe, feruloyl; S, sinapoyl; Bz, benzoyl; nd, not determined. Enzymes are first regroup depending on phenolamide synthetised, sub-groups represent common evolutive origin.

## Figure legends:

**Figure 1 Schematic representation of the connections between the phenylpropanoid and mono- poly-amine pathways at the origin of phenolamide structural diversity.** The six main phenolic acids constituting acyl donors are represented as CoA esters. The major groups of amines used as acyl acceptors are described together with their amino acid precursors. The final enzymatic step leading to phenolamide biosynthesis is supported by N-hydroxycinnamoyltransferases harboring specificity toward amine moieties. Few structures representative of phenolamide diversity are indicated, additional structures are given in Supplemental Figure 1.

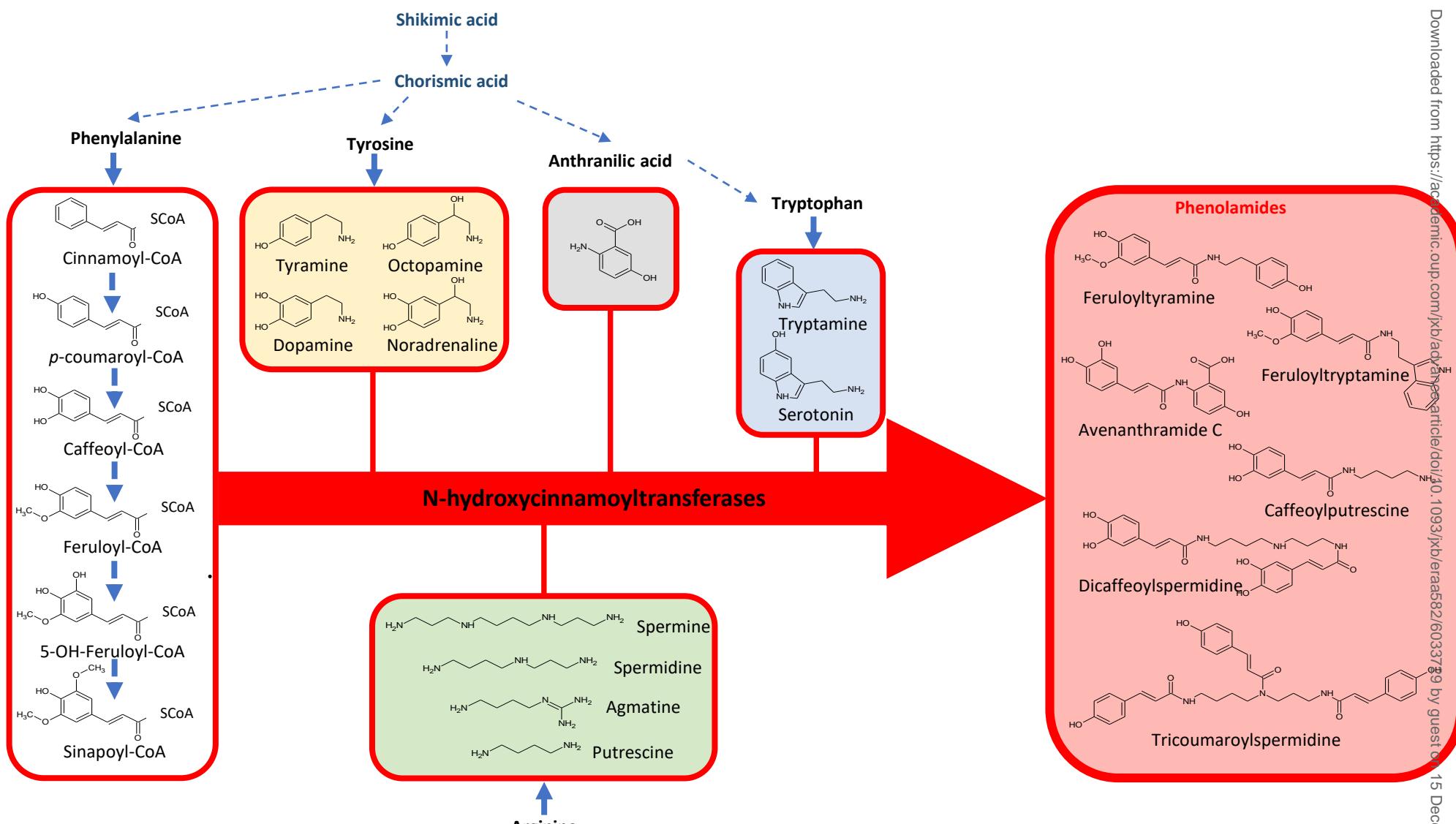
**Figure 2 Timeline showing the evolution of studies on phenolamides: Three main periods can be distinguished.** The first one from 1949, when the first phenolamide was identified until the review of Edreva et al. in 2007. The second period was from 2007 to 2015, and the last period from 2015 to the present. The blue boxes represent the major breakthroughs of each period. In the white boxes, major reviews are indicated.

**Figure 3 Phylogeny of characterized N-hydroxycinnamoyltransferases.** Protein sequences were aligned using ClustalX, and the phylogenetic tree was constructed using neighbor joining and bootstrap analysis. Black names correspond to the DAT family of GNAT acyltransferases for which only two representative members characterized in mammals and plants are mentioned (*HsSAT1* and *AtNATA1*). Colored names represent BAHD acyltransferases clades for which every characterized member is mentioned: clade Ia (blue), clade II (yellow), clade IIIa (magenta), clade IIIb (cyan), clade IV (orange), clade Va (red), and clade Vb (green). N-hydroxycinnamoyltransferases are indicated in bold, and clusters are highlighted with dark lines or marked with an asterisk. Amine acceptors used by members of each N-hydroxycinnamoyltransferase clusters are mentioned.

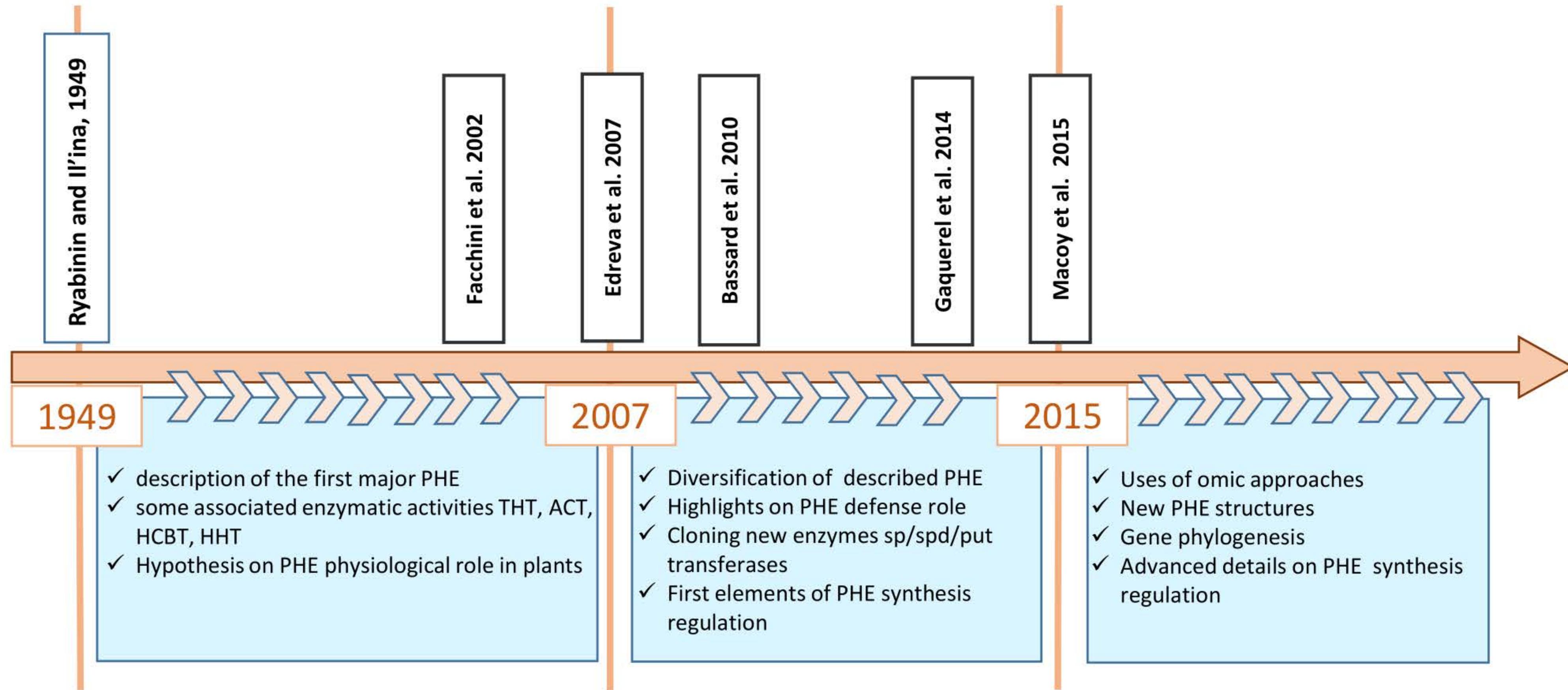
**Figure 4 Mechanisms of phenolamide accumulation under biotic stress in plants.** The orange box represents the mechanisms described in response to pathogen infection and the green box those in response to herbivory. Transcription factors are in bold and phytohormones in blue. In the case of pathogen infection, phenolamide accumulation relies on ethylene (ET) and jasmonic acid (JA) signaling pathways. ET activates different transcription factors (ERF, NAC) and ends by activating MYB factors that induce the expression of genes of the phenylpropanoid pathway, together with acyltransferases. In *Arabidopsis*, JA activates the *AtORA59* factor, which leads immediately to overexpression of the *AtACT* enzyme. Finally, a third pathway implies the activation of WRKY transcription factors through the MAPK pathway. In the case of herbivory, the JA signaling pathway is mainly activated. Once JA is accumulated, Coronatine Intensitivel (*COII*) degrades the Jasmonate Zim-Domain (JAZ) proteins and releases transcription factors belonging to the bHLH family MYC. The release of MYC2 activates the MYB transcription factor. Herbivory also induces the accumulation of other phytohormones and SmRNA, which can modulate the JA dependent response and/or contribute to a systemic accumulation of phenolamides. The mechanisms for such aspects of the regulation are still unclear. Plain lines represent a direct relationship between these elements, whereas dotted lines represent relationships between elements with probable intermediates. PAL: Phenylalanine Ammonia Lyase; 4CL: 4-coumarate: CoA ligase; C4H: Cinnamate-4-Hydroxylase; CP: CaffeoylPutrescine; CoP: *p*-coumaroylPutrescine; FP: FeruloylPutrescine; MCS: MonoCaffeoylSpermidine; DCS: DiCaffeoylSpermidine; CoT: *p*-coumaroylTyramine; FT: FeruloylTyramine; CoN: *p*-

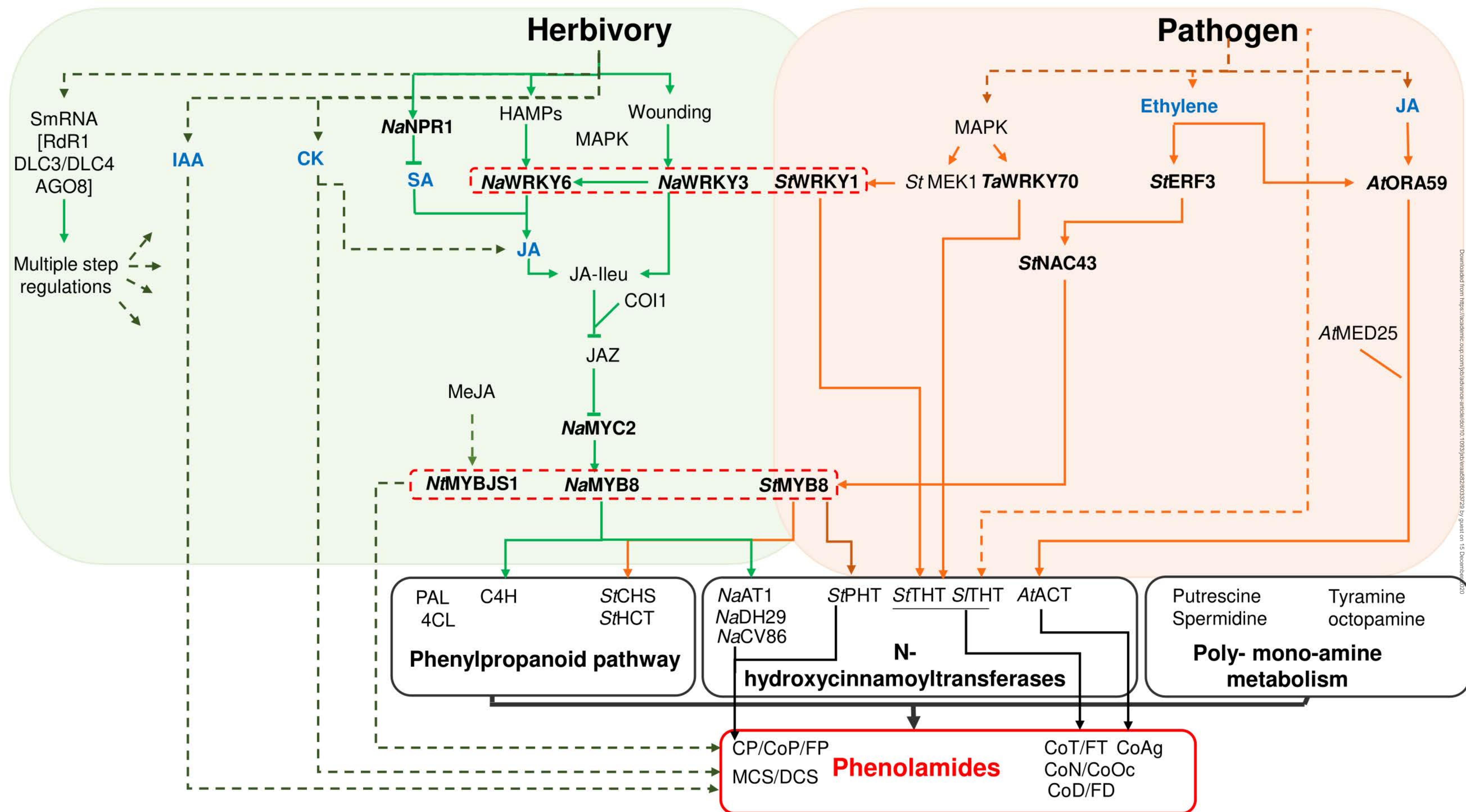
coumaroylNoradrenaline ; CoOc : *p*-coumaroylOctopamine ; CoD : *p*-coumaroylDopamine ; FD : FeruloylDopamine ; IAA : Indole Acetic Acid ; CK : Cytokinine ; SA : Salicylic Acid.

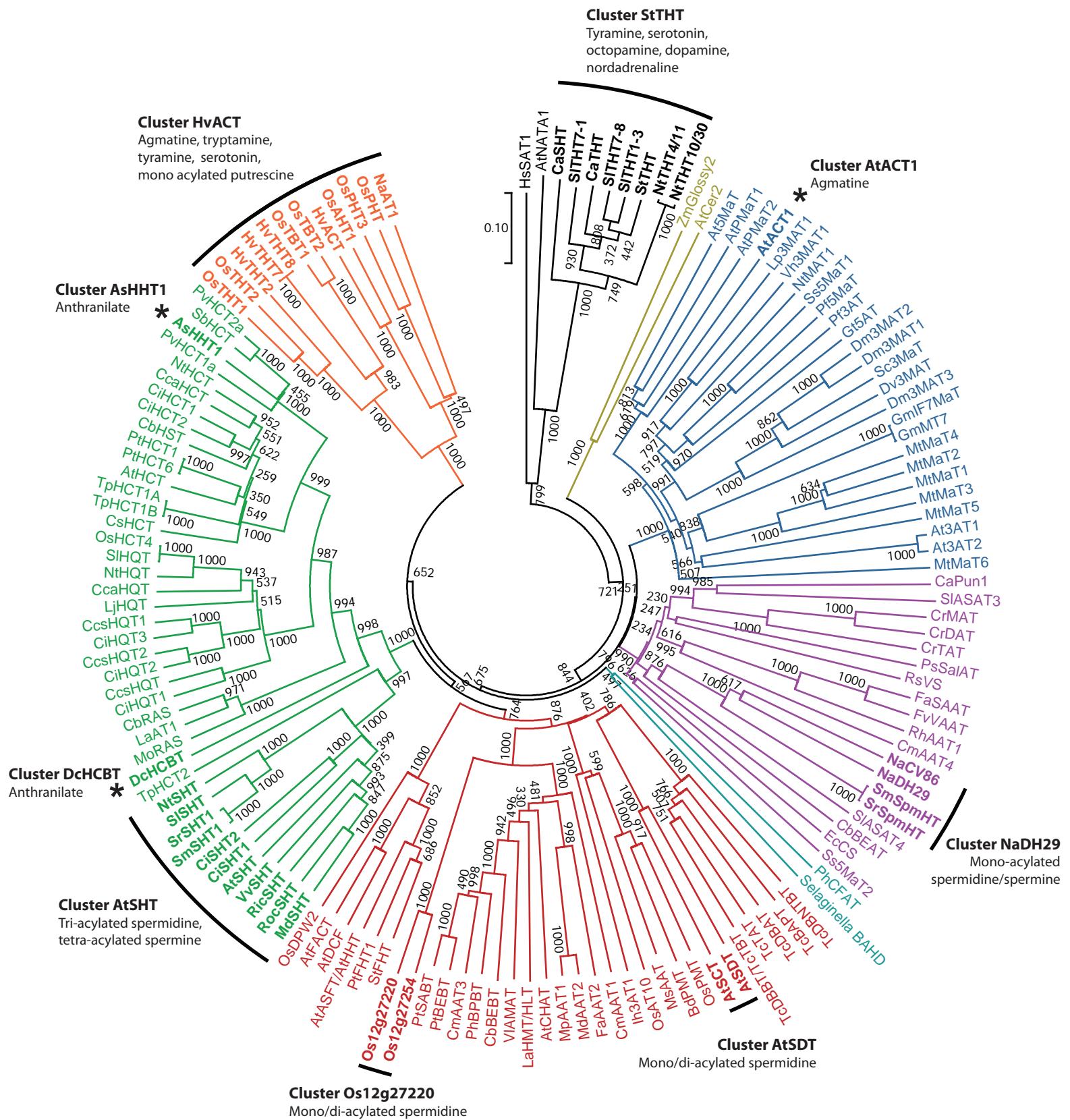
**Figure 5 Distribution of putative N-hydroxycinnamoyltransferase orthologues among Tracheophyta species.** Putative orthologues of N-hydroxycinnamoyltransferase were identified as described in Supplemental Figure 2. Hit numbers among plant orders for the accessions previously obtained were summarized in the table for each N-hydroxycinnamoyltransferase clusters. To avoid confusion between orders without identified orthologues, due to limitations in data availability rather than lack of orthologues, we applied our method on *AtHCT*. Since it is assumed that HCT is needed for lignification in Tracheophyta and is maintained among land plants (Kriegshauser et al. 2020), we specifically mention plant orders with hits for HCT orthologues. Therefore, the absence of hits for an N-hydroxycinnamoyltransferase cluster within an order indicated in the table, corresponds to the absence of predicted orthologues. In addition, the number of hits for HCT indicates the species diversity available in the database for each order.



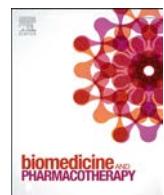
**Fig. 1. Schematic representation of the connections between the phenylpropanoid and mono- poly-amine pathways at the origin of the phenolamine structural diversity.**  
 The six main phenolic acids are represented as CoA esters. The major mono- and polyamines are described together with their amino acid precursors. The final enzymatic step leading to the phenolamine biosynthesis is supported by N-hydroxycinnamoyltransferases harboring specificity toward the amine moieties.







N-hydroxycinnamoyltransferase clusters										
	AtHCT 700 seq	HvACT 793 seq	SHT 276 seq	AtSDT 368 seq	Os12g27220 168 seq	AsHHT1 1 seq	AtACT1 134 seq	HCBT 24 seq	StTHT 121 seq	NaDH29 100 seq
<b>Tracheophyta</b>										
<b>Lycopodiopsida</b>										
Selaginellales	125	19								
<b>Euphyllophyta</b>										
<b>Filicopsida</b>										
Polypodiales	16	2								
<b>Spermatophyta</b>										
<b>Acrogymnospermae</b>										
Pinales	31	1								
<b>Angiospermae</b>										
<b>Basal angiosperms</b>										
Amborellales	37	22								
Nymphaeales	45	45								
<b>Mesangiospermae</b>										
<b>Magnoliids</b>										
Laurales	29	14								
<b>Monocots</b>										
Alismatales	44	6								
Asparagales	64	11								
Arecales	35	9				1				
Commelinaceae					45					
Zingiberales	102									
Poales	1225	670				244	1			
<b>Eudicots</b>										
Proteales	26	1								
Ranunculales	226	82				3				
<b>Coreeudicots</b>										
<b>Superrosids</b>										
Saxifragales	1									
<b>Rosids</b>										
Vitales	79		6	6						
<b>Fabids</b>										
Cucurbitales	80									
Fabales	896	2	63	163						
Fagales	125	6	12	7						
Malpighiales	391	51	17	16						
Rosales	508	10	88	50						
<b>Malvids</b>										
Brassicaceae	405	53	52	213			167			
Malvales	737	36		36						
Myrtales	201	14	11							
Sapindales	161		9	2						
<b>Superasterids</b>										
Caryophyllales	117	1	3				35			
<b>Asterids</b>										
Cornales	21		1	1						
Ericales	135	15	9	6						
<b>Lamiids</b>										
Gentianales	94	18		4						
Lamiales	209	41	15							
Solanales	234	82	27	2				134	120	
<b>Campanulids</b>										
Apiales	36									
Asterales	241	41	25							
Dipsacales	15	4								



## Review

## Phenolamides: Plant specialized metabolites with a wide range of promising pharmacological and health-promoting interests



Marwa Roumani<sup>a</sup>, Raphaël E. Duval<sup>b</sup>, Armelle Ropars<sup>c</sup>, Arnaud Risler<sup>b</sup>, Christophe Robin<sup>a</sup>, Romain Larbat<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR 1121, Laboratoire Agronomie et Environnement (LAE), Université de Lorraine- INRAe, Nancy, France

<sup>b</sup> Université de Lorraine, CNRS, L2CM, F-54000, Nancy, France

<sup>c</sup> Stress Immunity Pathogens Université de Lorraine, Nancy, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Phenolamides  
Kukoamine  
Putrescine  
Tyramine  
Clovamide  
Avenanthramide  
Human health

## ABSTRACT

Phenolamides constitute a family of metabolites, widely represented in the plant kingdom, that can be found in all plant organs with a predominance in flowers and pollen grains. They represent a large and structurally diverse family, resulting from the association of phenolic acids with aliphatic or aromatic amines. Initially revealed as active compounds in several medicinal plant extracts, phenolamides have been extensively studied for their health-promoting and pharmacological properties. Indeed, phenolamides have been shown to exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer and antimicrobial properties, but also protective effects against metabolic syndrome and neurodegenerative diseases. The purpose of this review is to summarise this large body of literature, including *in vitro* and *in vivo* studies, by describing the diversity of their biological properties and our actual knowledge of the molecular mechanisms behind them. With regard to their considerable pharmacological interest, the question of industrial production is also tackled through chemical and biological syntheses in engineered microorganisms. The diversity of biological activities already described, together with the active discovery of the broad structural diversity of this metabolite family, make phenolamides a promising source of new active compounds on which future studies should be focused.

## 1. Introduction

Phenolamides, also known as hydroxycinnamic acid amines (HCAA) or phenylamides, are plant specialized metabolites widely distributed in the plant kingdom [1–4]. The phenolamide structure is characterised by the association of at least one hydroxycinnamic acid derivative which is linked through an amide bond to an aromatic monoamine or an aliphatic polyamine (Fig. 1). In nature, the most common hydroxycinnamic acid derivatives are *p*-coumaric, ferulic, caffeic and sinapic acids, together with some glycosylated forms. Regarding the amine moieties, the aromatic monoamines are either phenolic (dopamine, octopamine, tyramine, noradrenaline, anthranilic acid) or indolic (serotonin, tryptamine) whereas the aliphatic polyamines differ in C length and N number (agmatine, putrescine, cadaverine, spermidine and spermine) (Fig. 1).

The combination of different hydroxycinnamic acid and amine moieties together with the possibility of one to four N-substitutions on aliphatic polyamines are responsible for the broad structural diversity for phenolamides. In a recent study, Li and coworkers constructed an *in*

*silico* phenolamide database containing more than 840 possible structures based only on the most common hydroxycinnamic acid and amine moieties [5]. Even if all these structures have not been detected in nature, the recent development of specific Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) methods has allowed for the detection of at least 79 different phenolamides from different organs in only four different plants (corn, wheat, rice and tobacco) [5,6].

The phenolamide distribution within plants is well-documented [1,4, 7–9]. They can be found in all plant organs and sometimes at high concentrations, especially at the surface of pollen grains and seeds [7, 10–12] or in wounded tissues [13,8,14,15]. Contrary to the knowledge on their occurrence and distribution, their physiological roles are still poorly understood. Roles in plant defence against pathogens and herbivores have been suggested and sometimes demonstrated [8,14,16,17]. However, no clear function is associated to their presence in large amounts in floral organs and pollen [11,18].

The bioactivity of phenolamides was initially investigated in the 1970s, and nowadays is mostly done in an ethnopharmacological

\* Corresponding author.

E-mail address: [romain.larbat@univ-lorraine.fr](mailto:romain.larbat@univ-lorraine.fr) (R. Larbat).

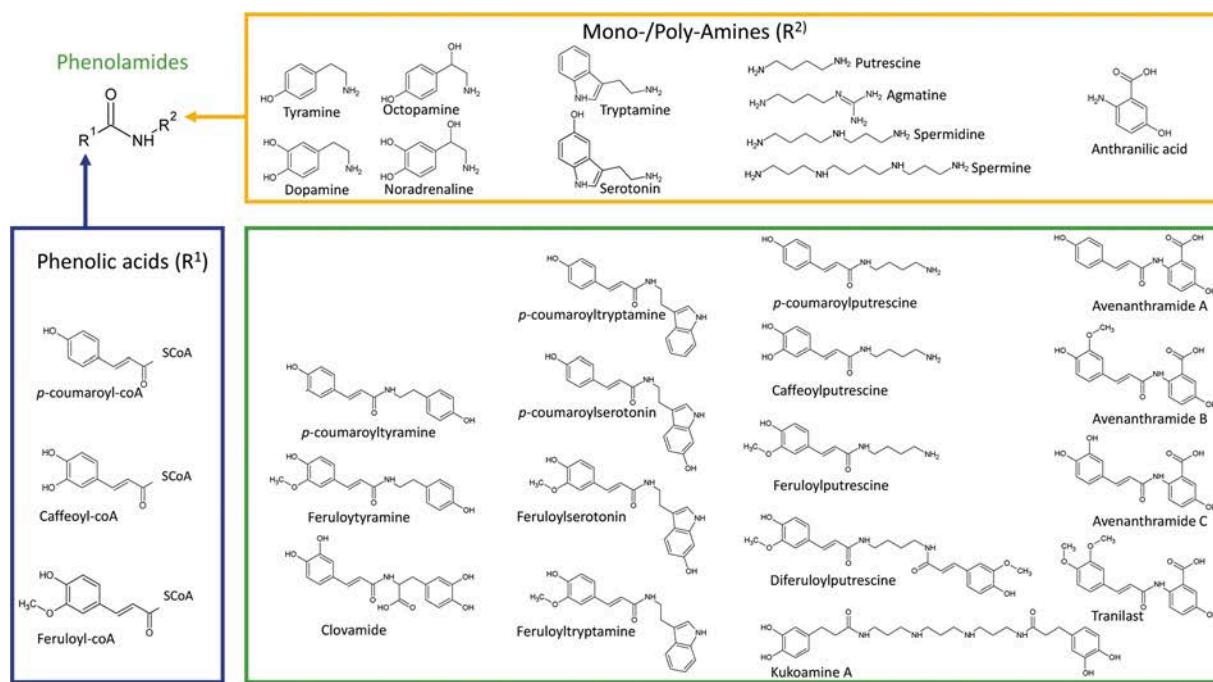


Fig. 1. Structural origin of phenolamide and representation of major structures.

context. Indeed, Asian medicinal herbs and berries, such as goji berries (wolfberries, fruits of *Lycium barbarum* L.), jikoppi (root bark from *Lycium chinense* Miller), shoo-fly herb (apple-of-Peru, *Nicandra physaloides* Schreb.), safflower (*Carthamus tinctorius* L.), Maltese cross (fruits of *Tribulus terrestris* L.), veloutier (*Heliotropium foertherianum* Diane & Hilger) and shān làng dàng (*Scopolia tangutica* Maxim.), which exhibit a plethora of properties beneficial to health, are rich in various phenolamides that have been screened and often revealed as active principles [19–21]. A recent review on *Lycium* genus phytochemistry reported 42 different phenolamides, representing about 12 % of the known metabolites in this genus [22]. Since then, this list has become longer [23–25]. In addition, the occurrence of phenolamides in edible vegetables such as eggplant (*Solanum melongena* L.), tomato (*Solanum lycopersicum* L.), cocoa (*Theobroma cacao* L.), oat (*Avena sativa* L.) and others has allowed us to consider them as potential health-promoting food ingredients. The range of health-related biological properties of phenolamides is wide. They include anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial and anti-cancer properties together with activities protecting humans from metabolic syndrome, cardiovascular diseases and neurodegenerative diseases. The objective of this review is to present the current state of art regarding the health-promoting and pharmacological properties of phenolamides with the molecular mechanisms supporting them. In addition, from the perspective of more intensive usage in the future, a section of this review will be devoted to their chemical and biological production in microorganisms.

## 2. Protective activities against metabolic syndrome

The metabolic syndrome groups a cluster of metabolic disturbances such as glucose intolerance, insulin resistance, dyslipidaemia and hypertension, which all constitute risk factors for atherosclerotic cardiovascular diseases, stroke and diabetes [26,27]. The emergence of metabolic syndrome is linked to an increase in obesity worldwide, associated with a high-fat/high-glucose diet [28]. Indeed, expanded adipose tissue appears as the major contributor to metabolic syndrome development by (i) increasing blood levels of fatty acids, which also contributes to hyperinsulinemia due to reduced insulin sensitivity in muscles and increased insulin export from the pancreas and (ii) inducing

a pro-inflammatory state, through the increased expression of two pro-inflammatory cytokines, interleukin (IL)-6 and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), which counteract the anti-inflammatory effect of the insulin-sensitising cytokine adiponectin. Increasing blood adiponectin levels is therefore a target to prevent metabolic syndrome. *In vitro*, the synthetic phenolamide *N*-(2-phenylethyl)ferulamide exhibits adiponectin inducing activity comparable to the reference drug pioglitazone in mouse 3T3-L1 cells and human pre-adipocytes [29]. This inducing effect is linked to the transcriptional activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) Retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) heterodimer. Bioassays on diabetic male KK-A $^y$ /Ta mice concluded that a diet containing 1% *N*-(2-phenylethyl)ferulamide significantly reduces blood glucose and triglyceride blood levels after 5 weeks [29].

Controlling the blood glucose level is another alternative to prevent metabolic syndrome.  $\alpha$ -glucosidase is involved in glycogen and starch hydrolysis to glucose. Among the phenolamides, *p*-coumaroyltyramine, *p*-coumaroylputrescine, feruloylputrescine and diferuloylputrescine have exhibited inhibitory activity against yeast  $\alpha$ -glucosidase [30–32]. In particular, *p*-coumaroyltyramine showed very high efficiency with a  $K_i < 1 \mu\text{M}$  and important specificity for  $\alpha$ -glucosidase, since  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -galactosidase and  $\alpha$ -mannosidase were not inhibited [31,32]. Molecular docking analyses of *p*-coumaroyltyramine on a homology model structure of  $\alpha$ -glucosidase indicated that it was positioned at the entrance of the active site and highlighted the importance of the phenolic acid moiety, specifically the hydroxyl group on the phenolic cycle and the double bond between the phenolic cycle and the amine group for the stabilisation of the inhibitor [32]. Kukoamine B ( $N^1$ ,  $N^{1\circ}$ -bis(dihydrocaffeoyl)-spermine) was recently shown to lower blood glucose in a type 2 diabetic mouse model (db/db) [33]. This effect on blood glucose was accompanied by a decrease in triglycerides, cholesterol and phosphatidylethanolamide, together with a reduction in several pro-inflammatory cytokines, making kukoamine B a potential candidate drug for the treatment of type 2 diabetes mellitus [33].

Atherosclerosis constitutes one of the major outcome risks of metabolic syndrome [34,35]. Atherosclerosis is an inflammatory process affecting the vessel walls of arteries, which can ultimately lead to cardiovascular diseases. This complex process is well-explained and described in a review by Galkina and Ley [36]. Feruloylserotonin and

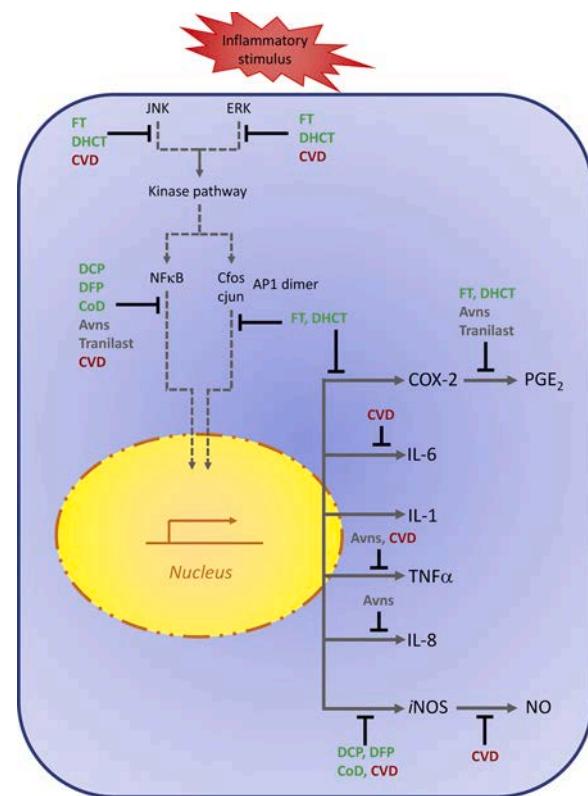
*p*-coumaroylserotonin were identified as the active components in safflower extract that exhibited anti-atherosclerotic properties. Indeed, supplementation of the diet with safflower (*Carthamus tinctorius* L.) extracts or serotonin derivatives to mice deficient in apolipoprotein E (a mouse model of atherosclerosis) reduced the atherosclerotic lesion area [20]. Since this effect was accompanied by a reduction in the plasma lipid peroxide level, it was concluded that *p*-coumaroylserotonin and feruloylserotonin may attenuate atherosclerotic lesion development through the oxidative protection of lipids. This study was confirmed on Kurosawa and Kusanagi-Hypercholesterolemic rabbits, in which long-term dietary supplementation led to a decrease in atherosclerotic lesions and higher vascular distensibility [37]. In addition, diet supplementation with safflower extract for 4 weeks in a small number of human volunteers led to a reduction in the plasma level of oxidised LDL, which was associated with a reduction in some cardiovascular risk markers [38].

The mechanisms of action of safflower serotonin derivatives to limit atherosclerotic lesion formation appear to be numerous. Indeed, Piga and collaborators have shown that *p*-coumaroylserotonin and feruloylserotonin inhibit *in vitro* adhesion and migration of the U-937 human monocyte cell line toward human endothelial aortic cells (HEAC), which are key steps in the early development of atherosclerotic lesions. This inhibition appeared to be linked to the antioxidant properties of these phenolamides, which interrupted the Reactive Oxygen Species (ROS)-dependent induction of Vascular Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), an adhesion factor for leukocytes, and that of Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1), a chemoattractant of monocytes synthesised by HEAC [39]. Another study indicated that *p*-coumaroylserotonin and feruloylserotonin inhibited, in a concentration-dependent manner, the phenylephrine-induced vasoconstriction state on rat femoral artery rings. They also inhibited the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) by blocking the Platelet Derived Growth Factor (PDGF) signalling cascade or the intracellular  $[Ca^{2+}]$  increase [40]. Interestingly, the oat-specific phenolamide, avenanthramides (Avns) also inhibited U-937 monocyte cell line adhesion to HEAC and decreased VCAM-1 and MCP-1 expression, as well as the expression of IntraCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) [41].

Platelet aggregation plays an important role in the mechanism of atherosclerotic plaque formation inside the artery. Among other phenolamides, feruloyltyramine, caffeoyleldopamine and hydroxybenzoyltyramine derivatives are able to inhibit platelet aggregation in the mouse. This effect is mediated by the inhibition of cyclooxygenase activity and a decrease in cAMP accumulation, which initiate the platelet aggregation cascade through P-selectin activation [42–43,44].

### 3. Vascular system

In addition to atherosclerosis, phenolamides appear to be beneficial molecules in other aspects of cardiovascular system disease. Indeed, the hypotensive property of the oriental medicine plant jikoppi has been attributed to  $N^1,N^{14}$ -bis(dihydrocaffeooyl)-spermine, also called kukoamine A [19]. This initial study did not determine the mechanisms underlying this property. However, a more recent study, devoted to identifying the bitter-active compounds of the tropical fruit lulo (*Solanum quitoense* L., Solanaceae), isolated two spermidine containing phenolamides, i.e. ( $N^1,N^4,N^8$ -tris(dihydrocaffeooyl)-spermidine and  $N^1,N^8$ , bis(dihydrocaffeooyl)-spermidine), with a structure very close to that of kukoamine A. Interestingly, the former metabolite exhibited strong inhibitory activity against Angiotensin-Converting Enzyme (ACE), a carboxypeptidase that plays an essential role in blood pressure regulation [45]. Docking analysis of  $N^1,N^4,N^8$ -tris(dihydrocaffeooyl)-spermidine and  $N^1,N^8$ , bis(dihydrocaffeooyl)-spermidine in the active site of ACE highlighted a strong protein-inhibitor interaction in both cases, mediated by a hydrophobic interaction through the aromatic ring and hydrogen bonds through the dihydrocaffeooyl moieties



**Fig. 2. Molecular targets mediating the anti-inflammatory properties of phenolamides in macrophage, dermal fibroblast and neuronal cell models.** Inflammatory stimuli induce kinase cascades involving JNK (c-Jun N-terminal kinase) and ERK (extracellular signal regulated kinase), which induce the nuclear translocation of NFkB and the activation of the AP1 (activator protein 1) transcription factor. As a consequence, the transcription of iNOS (inducible nitric oxide synthase), COX2 (cyclooxygenase 2), IL (interleukin)-1, -6, -8 and TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) is induced. The steps that are inhibited by phenolamides are represented in the scheme. The colour code indicates if it has been described in macrophages (green), dermal fibroblasts (grey) or neuronal (red) cells. CoD: *p*-coumaroyldopamine; FT: feruloyltyramine; DHCT: dihydrocaffeooyltyramine; DCP: dicoumarolputrescine; DFP: diferuloylputrescine; CVD: clovamide; Avns: avenanthramides.

[46]. Due to the structural homology of kukoamine A with these metabolites, it is reasonable to hypothesise that its hypotensive activity could be mediated by a similar mechanism.

Clovamide (N-caffeooyl-dihydroxyphenylalanine) is a phenolamide initially isolated from red clover (*Trifolium pratense* L.) [47], largely present in the *Trifolium* genus and in cocoa (*Theobroma cacao* L.). This phenolamide exhibited a protective effect against oxidative stress on the rat cardioblast cell line H9c2. It acts by limiting the ROS content in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated H9c2 cells, also by decreasing apoptosis events, such as DNA fragmentation and caspase activation [48]. This antioxidant effect on cardioblast cells is interesting since myocardial damage after heart attack and/or stroke is usually caused by sequential ischemia/reperfusion, which promotes oxidative stress [49]. Clovamide has also been demonstrated to limit oxidative stress-induced damage to blood platelets and plasma [50].

### 4. Anti-inflammatory properties

Inflammation is a complex process involved in the immune response of an organism to various stimuli such as infection and/or tissue injury [51]. This process is temporally and spatially controlled by plasma and cellular regulators and is viewed as a lever to maintain the basal homeostatic state. The modern lifestyle, through different stressors such as

a high-fat and/or high-glucose diet, constantly impacts on basal homeostasis, and may induce a chronic inflammatory state [51,52]. Chronic inflammation is a risk factor and a contributor to a large array of chronic diseases, including type 2 diabetes [53], cardiovascular diseases [54], cancers [55,56] and neurodegenerative diseases [57]. Identifying and characterising efficient, possibly natural-source anti-inflammatory molecules is thus of major concern. Numerous phenolic compounds are efficient anti-inflammatory molecules [58]. Several studies have evaluated the anti-inflammatory properties of phenolamides, as part of active principle from natural sources (food, herbal medicine) or as chemically synthesised compounds. Due to the complexity of inflammatory processes, multiple targets and markers for anti-inflammatory properties have been studied, and inter-molecule and inter-study comparisons are often difficult. For the ease of the reader, the anti-inflammatory properties of phenolamides are summarised in Fig. 2.

A classical model to study potential anti-inflammatory properties of molecules is to stimulate monocytes and/or macrophages with pro-inflammatory molecules such as lipopolysaccharide (LPS) and verify if the added molecule(s) is able to counteract this effect. For example, using the murine RAW 267.4 cell line stimulated with LPS, several phenolamides including tyramine, dopamine, tryptamine, spermidine, anthranilic acid and phenethylamine derivatives have been screened and demonstrated to inhibit the production of nitric oxide (NO) with  $IC_{50}$  values ranging from 2 to 50  $\mu M$  [59–65]. The mechanisms involved have been deciphered in the case of dihydrocaffeoyletyramine, feruloyltyramine, *p*-coumaroyldopamine, dicoumarolputrescine, diferuloylputrescine, avenanthramides (Avns) and clovamide (Fig. 2). Dicoumarolputrescine, diferuloylputrescine and *p*-coumaroyldopamine were shown to inhibit the nuclear translocation of the transcription factor NF $\kappa$ B, which stimulates the transcription of numerous genes such as the pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6 and TNF $\alpha$  [59, 66]. Dihydrocaffeoyletyramine and feruloyltyramine inhibit prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) synthesis by controlling cyclooxygenase 2 (COX-2) expression. Both tyramine derivatives inhibit transcription factor activating protein 1 (AP1) and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP $\beta$ ) nuclear translocation by blocking c-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylating activity [60,65,67]. The anti-inflammatory activity of tyramine derivatives (dihydrocaffeoyleyl- and caffeoyl) has been confirmed in other cell types, such as the human embryonic kidney cell line (HEK-293). Again, this activity was mediated by the inhibition of NF $\kappa$ B nuclear translocation [68]. Interestingly, these two phenolamides exhibited contrasted anti-inflammatory efficiencies, indicating that the C7-C8 double bond of the phenolic moiety (the only difference between the two molecules) was important for this activity. In a skeletal muscle cell line (C2C12), Avns inhibited TNF $\alpha$ -induced inflammation through a reduction in NF $\kappa$ B translocation, the downregulation in IL-1 and IL-6 expression and impaired ROS accumulation [69,70]. Interestingly, molecular docking studies revealed that Avns (A, B and C) inhibit the NF $\kappa$ B pathway through an allosteric inhibition of I $\kappa$ B kinase b (IKK $\beta$ ) [70,71].

Another phenolamide, clovamide, has been studied on human monocytes pretreated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and has shown a strong anti-inflammatory activity. Clovamide inhibits superoxide anion production and TNF $\alpha$  and IL-6 synthesis. This inhibition appears again to be mediated by the inhibition of NF $\kappa$ B nuclear translocation [72].

Oatmeal has long been used to treat itch associated with diverse xerotic dermatitis [73]. Avenanthramides appear to be associated at least partly with this property, since they exhibit anti-inflammatory activity on dermal fibroblasts, keratinocytes and mast cells [74–77]. Purified Avns limit TNF $\alpha$ -induced keratinocyte inflammation by reducing the expression of NF $\kappa$ B and the release of IL-8 [75]. The synthetic Avn Tranilast reduces dermal fibroblast inflammation by decreasing the expression of COX-2, which negatively impacts PGE<sub>2</sub> production [74,78]. Interestingly, the topical application of purified Avns reduces both neurogenic inflammation and the immune-mediated

allergic response in a murine itch model [75].

## 5. Neuroprotective properties

Neurodegeneration is the basis of numerous pathologies, including ischemic stroke and neurodegenerative diseases (Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, etc.). Neurodegeneration is a complex process that can be induced notably by oxidative and inflammatory stresses [79–81]. The anti-inflammatory properties of clovamide and its derivatives were confirmed *in vitro* using specific cellular models of neuro-inflammation such as LPS treated BV-2 cells or SH-SY5Y cells [82–84]. Clovamide synthetic derivatives appeared to efficiently inhibit NO production in inflammation-induced cells. This was the consequence of multistep impact on the induced inflammation pathway (Fig. 2) which included the inhibition of JNK, extracellular signal-regulated kinase-mitogen activated protein kinase (ERK-MAPK) and I $\kappa$ B phosphorylation [83], as well as the inhibition of NF $\kappa$ B nuclear translocation [83,84], as well as the inhibition of IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , inducible nitric oxide synthase (iNOS) and COX-2 expression [83–85]. Finally, direct inhibition of the iNOS activity has been demonstrated for some clovamide derivatives, supported by molecular docking evidence for the active site of iNOS [84].

A larger panel of phenolamide structures including clovamide derivatives, kukoamine A, tyramine and octopamine derivatives have been studied for their neuroprotective properties using *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced and neurotoxin-induced cell models [86–89]. Indeed, kukoamine A and the clovamide derivative caffeoylphenylalanine methyl ester reduced ROS production in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SH-SY5Y cells. In addition, they inhibited the induction of apoptosis by reducing mitochondrial membrane potential (MMP) loss, modulating the level of malondialdehyde (MDA) and affecting the level of apoptotic markers such as the Bax/Bcl2 ratio and cleaved caspase-3 [86,89]. Kukoamine A blocked N-Methyl-D-Aspartate Receptors (NMDARs), a key element involved in neuronal excitotoxicity [86]. The neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP $^+$ ) is used on SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells as an *in vitro* model of Parkinson's disease (PD). With this model, *cis*-feruloyltyramine isolated from *Nicandra physaloides* and kukoamine A were demonstrated to inhibit apoptosis in MPP $^+$ -induced cells and to promote autophagy [87,88].

The neuroprotective properties of previously cited phenolamides has gained support from *in vivo* assays on PD murine models consisting of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxicated mice. Indeed, the administration of kukoamine A, caffeoylphenylalanine and clovamide derivatives (from 10 to 20 mg/kg) alleviated the dyskinesia symptoms of these mice. These molecules also reduced apoptosis and oxidative stress and stimulated tyrosine hydroxylase accumulation, thereby supporting dopamine biosynthesis in the substantia nigra and striatum of mice, which are the brain areas especially affected in PD [83, 84,88,89]. Transgenic fruit flies (*Drosophila melanogaster*) over-producing Amyloid (A $\beta$ ) oligomers are used as a model of Alzheimer disease (AD) [90]. These transgenic flies exhibit several features of AD, including short-term memory loss, that can be quantified through a well-established aversive Pavlovian olfactory conditioning assay in which flies are trained to avoid an odour associated with an electric shock [91]. Whereas transgenic flies with AD symptoms did not avoid the odour associated with the electric shock, those fed with wolfberry kukoamine derivatives were preferentially attracted by the odour not associated with the electric shock, indicating a partial recovery of short-term memory [92]. This result is corroborated by the ability of wolfberry water extract to inhibit A $\beta$ 1-42 aggregation [93]. Recently, the oral administration of Avn-C to AD transgenic mice (Tg2576 and 5XFAD) was shown to partially restore their spatial memory capacities. Although the mechanisms remain unclear, the oral administration of Avn-C reduced caspase-3 cleavage, ameliorated neuroinflammation and increased the accumulation of IL-10 [94].

**Table 1**

Antioxidant properties of phenolamides reported in the literature.

Molecules	EC <sub>50</sub> (μM)						References
	DPPH scavenging activity (%)	PTIO <sup>•-</sup> scavenging	Cu <sup>2+</sup> reduction	DPPH scavenging	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> scavenging	OH <sup>•</sup> scavenging	
<i>N</i> -E-coumaroyltyramine	96						
<i>N</i> -E-feruloyltyramine	96						
Lyciumamide A	76						[[97]]
Lyciumamide B	73						
Lyciumamide C	90						
Kukoamine A		119	10	87	401	168	Xican et al. 2018
Kukoamine B		29	9	74	278	147	
Kukoamine A	96						
Kukoamine B	97						[101]
Kukoamine C	0						
Kukoamine D	42						
Di-coumaroylputrescine				>500	>10000	165	
Di-feruloylputrescine				38	292	352	[95]
Coumaroyl-feruloylputrescine				70	488	193	
<i>N</i> -trans-feruloyl- <i>N'</i> -cis-feruloyl-cadaverine				>100			
<i>N,N'</i> -trans-diferuloyl-3-oxo-cadaverine				>100			
<i>N</i> -trans-feruloyl- <i>N'</i> -cis-feruloyl-3-hydroxy-cadaverine				37			
<i>N,N'</i> -cis-diferuloyl-3-hydroxy-cadaverine				>100			
<i>N</i> -trans-p-coumaroyl- <i>N'</i> -trans-feruloyl-3-hydroxy-cadaverine				>100			[99]
Diferuloylcadaverine				38			
<i>N,N'</i> -Diferuloylputrescine				41			
(E,Z)-Terrestribisamide				>100			
(Z,Z)-Terrestribisamide				67			
<i>N</i> -trans- <i>o</i> -coumaroyldopamine	78			28			
<i>N</i> -trans- <i>m</i> -coumaroyldopamine	74			36			
<i>N</i> -trans-feruloyldopamine	73			45			
<i>N</i> -trans- <i>p</i> -coumaroyldopamine	24			406			
<i>N</i> -trans-feruloyl-3-methyldopamine	64			70			
<i>N</i> -trans-feruloyl-4-methyldopamine	43			165			
<i>N</i> -trans-isoferuloyl-dopamine	76			35			
<i>N</i> -trans-isoferuloyl-3-methyldopamine	45			155			[66]
<i>N</i> -trans-isoferuloyl-4-methyldopamine	33			288			
<i>N</i> -trans- <i>o</i> -coumaroyl-3-methyldopamine	39			217			
<i>N</i> -trans- <i>m</i> -coumaroyl-3-methyldopamine	31			874			
<i>N</i> -trans- <i>p</i> -coumaroyl-3-methyldopamine	34			279			
<i>N</i> -trans- <i>o</i> -coumaroyl-4-methyldopamine	28			348			
<i>N</i> -trans- <i>m</i> -coumaroyl-4-methyldopamine	34			279			
<i>N</i> -trans- <i>p</i> -coumaroyl-3-methyldopamine	38			225			

## 6. Antioxidant properties

In addition to their capacity to modulate kinase cascade pathways, which in turn may increase the antioxidative potential of cells and organs (described above), phenolamides have been described as efficient antioxidative and antiradical agents (Table 1). The characterisation of these properties has been documented in several studies using diverse assays assessing antiradical activities (DPPH, PTIO, ORAC, ·OH, ·O<sub>2</sub><sup>•-</sup>...) and metal chelating activity (Fe, Cu) [66,95–100].

Interestingly, since phenolic acids, polyamines and aromatic amines are already known to be efficient antioxidative agents [102–103,104], their combination as phenolamides tends to potentiate this characteristic [98,101,105]. Several structure-function studies that focused on phenolamide subfamilies provided a better understanding of the structural features supporting their ROS-scavenging activity. Indeed, for dihydrocaffeoyl-spermine derivatives, referred as kukoamines, the position of the dihydrocaffeoyl moieties on the spermine nitrogens has a considerable impact on radical scavenging activity (DPPH test); kukoamine B (N<sup>1</sup>, N<sup>10</sup> bis DiHydroCaffeoyl spermine) and A (N<sup>1</sup>, N<sup>14</sup> bis DHC spermine) show higher activity than kukoamine C (N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup> bis DHC) and D (N<sup>1</sup>, N<sup>5</sup> bis DHC spermine) [101]. In addition, replacement of dihydrocaffeoyl moieties with caffeoyl moieties or feruloyl moieties shows the importance of chain flexibility in the DHC and the presence of hydroxyl groups on the phenolic ring [101]. In addition to their radical scavenging activity on DPPH, kukoamine A and B were found to be efficient scavengers of other radicals such as PTIO, ·OH and

·O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, indicating several possible mechanisms including proton transfer, electron transfer, hydrogen atom transfer or radical adduct formation. In addition, these two compounds were also able to chelate iron [106]. In the case of phenolamides integrating an aromatic amine (dopamine, tryptamine, tyramine, phenylethylamine), comparative analysis based radical scavenging activity (DPPH assay) led to the conclusion that, among the phenolic moieties, the caffeoyl structure was the most efficient, whereas for the amine part, dopamine is most effective [107]. The catechol function present in the amine part of dopamine is more effective than the catechol function on the feruloyl moieties in terms of sustaining electron transfer and, consequently, radical scavenging property [105].

## 7. Antimicrobial properties

Due to the constant increase in the number of infectious diseases and the concomitant lack of available treatments for certain diseases and antibiotic resistance, research and development into new antimicrobial agents is urgently needed to confront this major public health problem [108]. The literature regarding the antimicrobial activities of phenolamide is relatively rare, and the methodology used to define the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) is often different between studies and does not always follow international norms, which makes comparison difficult. To summarise the available data, we define three efficiency levels, based on the MIC categorisation (see details in Table 2). In a general way, phenolamides are mostly described as medium to low

**Table 2**

A/B: Antimicrobial activities of phenolamides. The efficiency is represented by symbols defining three categories: +++ MIC < 50 µg/mL; ++ 50 < MIC < 99 µg/mL; + MIC > 100 µg/mL. References are given by superscript letters. a [107]; b [109]; c [110]; d [182]; e [111]; f [183] Kyselka et al., 2018.

Molecules	<i>B. subtilis</i> 1A95 <sup>a</sup>	<i>L. monocytogenes</i> C12 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> 209 <sup>a</sup>	<i>S. pyogenes</i> 10535 <sup>a</sup>	<i>S. aureus</i> NBIMCC 3359 <sup>d</sup>	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P <sup>d</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20628 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20630 <sup>b,c</sup>
Dihydrocaffeoylepropanediamine							++	++	++
Dihydrocaffeoyleputrescine							+++	++	++
Dihydrocaffeoylecadaverine							++	++	++
Dihydrocaffeoylehexanediamine							+	++	++
<i>N1-N9</i> -Bis(dihydrocaffeoyle) norspermidine							++	+++	+++
<i>N1-N10</i> -Bis(dihydrocaffeoyle) spermidine							++	+++	+++
Kukoamine A									
Tri(dihydrocaffeoyle) spermine							+++	++	++
Tetra(dihydrocaffeoyle)polyamine							+++	+++	+++
Caffeoylysine							+	+	
Cinnamoyldopamine	+	+	+	+	+				
Coumaroyldopamine	+	+	+	+	+				
Caffeoylphenylethylamine	+	+	+	+	+				
Caffeoyldopamine	+	+	+	+	+				
Caffeoyltyramine	+	+	+	+	+				
Caffeoyltryptamine	+	+	+	+	++				
Feruloyldopamine	+	+	++	+	+				
Feruloyltyramine	+	+	++	+	+				
Feruloyltryptamine	+	+	+	+	+				
Sinapoyldopamine	+	+	+	+	+				
Sinapoyltyramine	+	+	++	++	++				
Sinapoyltryptamine	+	+	+	++					

efficiency antimicrobial agents (Table 2). Regarding antibacterial activities, the most active compounds exhibiting a MIC value below 99 µg/mL were found against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* [107,109,110]. Dihydrocaffeoyle moieties appeared to be very important, as they confer antibacterial activity against several strains of *S. aureus*, including methicillin resistant (MRSA) and vancomycin resistant (VRSA) strains (MIC < 50 µg/mL) [109,110]. Dihydrocaffeoyletyramine, *trans*-feruloyloctopamine and *trans*-feruloyltyramine, extracted from the root bark of *Lycium chinense* Mill., exhibited also significant antifungal activities (5 µg/mL < MIC < 10 µg/mL) against *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Trichosporon beigelii* [111].

Despite their generally moderate antimicrobial activity, the contribution of phenolamides in complex extracts exhibiting antimicrobial activities is still unclear and deserves better attention. Indeed, phenolamide-rich extracts such as *Lycium barbarum* and *Lycium chinense* leaf extracts also exhibited significant antibacterial activities against *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* [112]. In addition, a study by Michalet et al. [113] reported the capacity of N-trans-4'-methyldopamine, isolated from *Mirabilis jalapa*, to inhibit NorA multidrug efflux pumps overexpressed in *S. aureus*. Bacterial efflux pumps contribute to the multidrug resistance phenotype by extruding a wide range of exogenous compounds, including antibiotics [114]. The use of efflux pumps inhibitors (EPI) could be an interesting strategy to restore antibiotic sensitivity to multidrug resistant strains. A structure-function analysis of this activity concluded that maximal NorA efflux pump inhibition was observed with phenolamides bearing two hydroxyl groups in the phenolic ring and an indolic group [113].

The antimicrobial activity of phenolamides has also been extended to kinetoplastids. The latter represent a class of parasitic protists, with three of them causing major human tropical diseases: human African trypanosomiasis, Chagas disease and leishmaniasis. Research into new antikinetoplastids is highly active. Among the potential targets,

identification of a trypanothione synthase inhibitor is promising, as reported in a recent review by Jagu et al. [115]. The trypanothione pathway regulates the redox potential in kinetoplastids. Trypanothione is synthesised by trypanothione synthase from two molecules of glutathione and one of spermidine. The design of trypanothione synthase inhibitors based on spermidine analogues seems very promising [115]. In this context, kukoamine A and analogues have been successfully screened as trypanothione synthase inhibitors [116].

## 8. Anti-cancer properties

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, with an estimated 18.1 million new cancer cases and 9.6 million deaths in 2018 [117]. These indicators are still in progress due to many factors, including the increase in and ageing of the population, environmental impacts and socioeconomic development [118,119]. In high-income countries, the emergence cancer is slowly decreasing thanks to intensive research and innovation in the field in recent decades [120]. Nevertheless, the road is still long to find efficient treatments against the multiple forms of cancer, and the search for novel effective therapeutics is still needed.

The anticancer properties of phenolamides have been investigated and reported only for several metabolites and cancer types. According to Rocha et al. [121], who reviewed the anticancer properties of hydroxycinnamic acids, these properties can be discriminated into three categories based on the mechanism of action: (i) blockade of the cell cycle, (ii) induction of apoptosis and (iii) inhibition of metastasis. Current knowledge on phenolamide anticancer activities is summarised in Table 3.

### 8.1. Breast cancer

Breast cancer was the most diagnosed cancer among women

A represents available data on antibacterial activities.

<i>S. aureus</i> MRSA 20631 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20632 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20633 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20635 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20636 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20652 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20653 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> MRSA 20654 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> VRSA 20622 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> VRSA 20623 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> VRSA 20624 <sup>b,c</sup>	<i>S. aureus</i> VRSA 21083 <sup>b,c</sup>
++	++	++	+++	+++	+	+++	++	+	++	++	+++
+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	+++
++	++	++	+++	++	++	++	++	++	+++	++	+++
++	++	++	+++	++	+	+++	+++	+	++	++	+++
+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
++	++	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++

worldwide in 2018 [117]. Mitsis et al. [129] identified *p*-coumaroylserotonin as a cytotoxic compound against a breast carcinoma cell line (MCF-7), which could act through multiple pathways. Indeed, it blocked the cell cycle at the S-phase and induced apoptosis through caspase-8 activation. In addition, *p*-coumaroylserotonin decreased the accumulation of several cluster of differentiation (CD) markers like CD24, CD44, CD58 and CD71, all overexpressed in aggressive cancer cells with high metastasis potential. Avns purified from oat greatly impacted the viability of MDA-MB-231, another human breast cancer cell line. Among the major isoforms, AvnC was the most effective and acted through the induction of apoptosis [130]. Two synthetic Avns, i.e. Tranilast and dihydro-AvnD, also exhibited anticancer properties against breast tumour cell lines. The former inhibited cell growth and migration as well as colony formation in the BT6474 and MDA-MB-231 cell lines [131]. The latter decreased the invasion of MCF-7 cells by inhibiting the MAPK/NF $\kappa$ B and MAPK/AP-1 pathways and by suppressing Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) expression [132].

## 8.2. Leukaemia

Leukaemia is a cancer affecting blood cells. Several human leukaemia cell lines, namely U-937, Jurkat and HL-60, have been used as *in vitro* models to study the potential anticancer properties of tyramine- and putrescine-derived phenolamides. Among the tyramine-derived phenolamides, both caffeoyl and coumaroyl moieties exhibited anti-cancer activity, the former being the most effective [126,127]. These two molecules induced cell cycle arrest at the S-phase and the induction of caspase-3 activity, indicating possible pro-apoptotic properties. In addition, caffeoyl- and *p*-coumaroyl-tyramines can inhibit the tyrosine kinase activity of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) involved in several signalling cascades leading to cell proliferation, invasion and metastasis. Among the polyphenolic compounds purified from corn bran, diferuloylputrescine (DFP) was shown to be the most

effective against the U-937 cell proliferation [128]. DFP acted as an inducer of the apoptotic process which was characterised by chromatin condensation, DNA fragmentation, cytochrome c release and caspase-3 activation. Addition of DFP to the U-937 cell culture medium decreased the expression of anti-apoptotic markers such as Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) and the Bcl2 family proteins. Interestingly, DFP also exhibited pro-apoptotic properties against the Caki cell line, an *in vitro* model of kidney carcinoma. The active concentration against the cancer cell line (100  $\mu$ M) was not cytotoxic to normal human fibroblasts [128].

## 8.3. Brain cancer

Among brain cancers, glioblastoma is certainly the most common but also the one with the worst prognosis [140]. *p*-coumaroylserotonin, which was effective against MCF-7 breast cancer cells, was also successfully tested, together with feruloylserotonin, on the U251MG and T98 G glioblastoma cell lines. *p*-coumaroylserotonin and feruloylserotonin reduced proliferation in the two cell lines by blocking the cell cycle at the G2/M and S phases and by triggering apoptosis (through the activation of caspase-8 in the case of *p*-coumaroylserotonin) and the collapse of mitochondrial membrane potential [122,123]. In addition, feruloylserotonin suppressed the expression of CD24 and CD44, two markers of cancer stem cells [123]. *p*-coumaroylserotonin and feruloylserotonin were found to be non-toxic to zebrafish even at a high concentration (1 mM). The crude extract from *Lycium chinense* root bark also impacted glioblastoma cell growth. The active component of this crude extract is kukoamine A, which was able to block the cell cycle of U251 and WJ1 cell lines at G0-G1 phase. In addition, it had pro-apoptotic properties through a reduction in 5-LOX and Bcl2 expression, concomitant with an increase in Bax and caspase-3 expression. Finally, kukoamine A also reduced cell migration and cell invasion by modulating the expression of specific markers such as C/EBP $\beta$ ,

**Table 3**

Anticancer properties of phenolamides reported in the literature.

Molecules	Cancer type	Model	Cell cycle arrest properties	Pro-apoptosis properties	Anti-metastasis properties	References
<i>p</i> -Coumaroylserotonin	Brain	U251MG T98G	Blocks cells at G2/M and S phases	Induces caspase-8 Induces mitochondrial membrane depolarisation		[122]
Feruloylserotonin	Brain	U251MG T98G	Blocks cells at G2/M and S phases	Induces caspase-8 Induces mitochondrial membrane depolarisation	Reduces the expression of CD24 and CD44	[123]
Grossamide and methylgrossamide	Brain	GSC-3# GSC-12#				[23]
Kukoamine A	Brain	U251 WJ1	Blocks cells at G0/G1-phase	Reduces 5-LOX and Bcl2 expression level Increases Bax and caspase-3 expression level	Reduces C/EBP $\beta$ , N-cadherin, vimentin, Twist, Snail, Slug expression Increases E-cadherin expression level Reduces 5-LOX expression level Inhibits cell migration Inhibits cell invasion	[124]
Tranilast	Brain	LN18 T98G 9 L Rat	Blocks cells at S phase Increases the cellular level of p21		Inhibits the release of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 Inhibits cell migration and invasiveness Decreases the size of the tumour <i>in vivo</i> Decreases MMP-2 activity	[125]
<i>p</i> -Coumaroyltyramine	Leukaemia	HL60 U937 Jurkat	Blocks cells at S-phase Inhibits tyrosinase activity of EGFR	Induces caspase-3		[126,127]
Caffeoyltyramine	Leukaemia	HL60 U937 Jurkat	Blocks cells at S-phase Inhibits tyrosinase activity of EGFR	Induces caspase-3 Induces DNA fragmentation		[127]
Di-feruloylputrescine	Leukaemia	U937		Decreases the expression of cIAP2, XIAP, Induces the cleavage of PLC-g and PARP Induces the release of cytochrome c Induces chromatin condensation Induces DNA fragmentation Bcl2, Mcl-1 and pro-caspase 3 Inhibits NF $\kappa$ B promoter activity		[128]
<i>p</i> -Coumaroylserotonin	Breast	MCF-7	Blocks cells at S-phase	Induces Caspase-8	Reduces the CD24, CD44, CD58 and CD71 expression level	[129]
Avenanthramide C	Breast	MDA-MB-231	Blocks cells at subG1 phase	Induces DNA fragmentation Induces apoptosis Induces caspase 3 and 7 activity		[130]
Tranilast	Breast	MDA-MB-231 BT-474		Induces the cleavage of PARP	Reduces the accumulation of MRTF-A Reduces the clonogenicity of cells Inhibits cell migration	[131]
Dihydro-avenanthramide D	Breast	MCF-7			Blocks the induction of MMP-9 protein and its excretion Inhibits NF $\kappa$ B and AP-1 activation Inhibits the JNK pathway Inhibits the ERK pathway	[132]
Di-feruloylputrescine	Kidney	Caki		Induces apoptosis		[128]
Tranilast	Pancreas	PGHAM-1	Blocks cells at G0-G1 phase		Decreases angiogenesis in dorsal air sac models	[133]
Natural and synthetic avenanthramides	Colon	Caco-2; HCT116; HCT8; HT29		Induces caspase-2, - 3, - 8 activities AvnA increases miR-129-3p expression AvnA induces p53 and p21 protein accumulation	Inhibits expression of hTERT, COX-2 and MDR1 Inhibits COX-2 activity Reduces PGE <sub>2</sub> production AvnA inhibits DDX3 ATP hydrolysis activity Inhibits Snail1 and E-cadherin expression	[134–135, 136,137,138]
Natural and synthetic avenanthramides	Liver	Hep3B		Induces caspase-2, - 3, - 8 activities	Inhibits expression of hTERT, COX-2 and MDR1 Inhibits COX-2 activity Reduces PGE <sub>2</sub> production	[135]
N-feruloyloctopamine	Liver	Huh7, HCCLM3			Inhibits p38 MAPK and Akt phosphorylation Inhibits Slug expression Increases E-cadherin expression	[139]

**Table 4**

Summary of the antimelanogenic properties of phenolamides. The IC<sub>50</sub> values for mushroom, murine tyrosinase activity and melanin production are given in micromolar. The inhibition of human tyrosinase in melanoma cells is given as % for a phenolamide concentration of 100 μM.

Molecules	Mushroom Tyr Inhibition IC <sub>50</sub>	B16 Tyr (L-DOPA) Inhibition IC <sub>50</sub>	B16 Tyr (TYR) inhibition IC <sub>50</sub>	B16 melanin inhibition IC <sub>50</sub>	Human HMVII melanoma cell Tyr inhibition	References
<i>N1-(E)-N6-(Z)-di-p-coumaroylputrescine</i>	75.1					
<i>N1-acetyl-N5, N10-(E)-di-p-methoxy-coumaroylspermidine</i>	>100					
<i>N1-acetyl-N5 (Z), N10-(E)-di-p-methoxy-coumaroylspermidine</i>	>100					
<i>N1-acetyl-N5, N10-(Z)-di-p-methoxy-coumaroylspermidine</i>	>100					
<i>N1, N5, N10-(E)-tri-p-coumaroylspermidine</i>	20.3					
<i>Safflospersmidine A</i>	85.8					
<i>N1, N5, N10-(Z)-tri-p-methoxy-coumaroylspermidine</i>	>100					
<i>N1, N5-(Z), N10-(E)-tri-p-coumaroylspermidine</i>	31.7					
<i>N1, N5, N10-(Z)-tri-p-coumaroylspermidine</i>	85.8					[62,153, 152]
<i>N1, N10-(E) di-p-coumaroyl-N5-(Z)-caffeoyspermidine</i>	24.7					
<i>N1-(E), N10-(Z) di-p-coumaroyl-N5-(Z)-caffeoyspermidine</i>	21.5					
<i>N1-(E)-p-coumaroyl-N5 (Z) N10 (E)-di-caffeoyspermidine</i>	18.9					
<i>N1, N5-(E)-di-caffeoyl-N10 (E) p-coumaroylspermidine</i>	60.4					
<i>N1, N5, N10-(E)-tri-caffeoyspermidine</i>	24.6					
<i>N1, N5 (E), N10-(Z)-tri-caffeoyspermidine</i>	80.3					
<i>N1-p-methoxybenzoyl-N5 (Z)-N10 (E)-di-p-methoxy-coumaroylspermidine</i>	>100					
<i>N1, N5, N10, N14-(Z)-tetra-p-coumaroylspermine</i>	19.5					
<i>N-p-coumaroylserotonin</i>	74			245		[146]
<i>N,N'-di-coumaroylputrescine</i>	82.4	181.7	1056.7	3169.5		[62,153, 152,95]
<i>N-p-coumaroyl-N'-feruloylputrescine</i>		233.6	921.5	1257.6		[95]
<i>N,N'-di-feruloylputrescine</i>		291.3		733.6		[95]
<i>N-trans-feruloyltyramine</i>				<10		[151]
<i>N-trans-caffeoyletyramine</i>		–	–	30		[147]
<i>N-trans-caffeoyletryptamine</i>		–	–	14		[147]
<i>N-trans-caffeoyleserotonin</i>		28	15	55		[147]
<i>N-trans-caffeoyle-methoxy-tryptamine</i>		–	–	4		[147]
<i>N-trans-feruloyltryptamine</i>		–	>30	13		[147]
<i>N-trans-feruloylserotonin</i>	23	216	23; 191	48		[147,146]
<i>N-trans-protocacheuoyltyramine</i>		–	–	9		[147]
<i>N-trans-protocacheuoyltryptamine</i>		–	–	7		[147]
<i>N-trans-protocacheuoylserotonin</i>		73	3	43		[147]
<i>N-trans-resorcinoylserotonin</i>		42	15	39		[147]
<i>N-trans-guaiacoylserotonin</i>		211	>30	16		[147]
<i>N-trans-hydroxybenzoyltryptamine</i>		–	>30	0		[147]
<i>N-trans-hydroxybenzoylserotonin</i>		233	>30	9		[147]
<i>N-trans-benzoyltryptamine</i>		–	–	1		[147]
<i>N-trans-benzoylserotonin</i>		333	>30	23		[147]
<i>N-acetylserotonin</i>		311	>30	18		[147]
Serotonin		550	>30	15		[147]
5-Hydroxyindole		68	13	54		[147]

N-cadherin, vimentin and TWIST at the protein level. Most interestingly, kukoamine A was successfully assayed *in vivo* in rats grafted with WJ1 glioblastoma cells. Repeated intra-peritoneal inoculation of kukoamine A at 10 mg/kg for 4 weeks led to a 30 % reduction in tumour weight in comparison to control. This effect increase to a 50 % reduction with kukoamine A at 20 mg/kg [124]. The synthetic Avn Tranilast was also shown to be effective in reducing the proliferation, migration and invasiveness of the LN-18 and T98 G malignant human glioma cell lines. Tranilast reduced DNA synthesis and blocked cells in the S phase. Moreover, it increased the accumulation of the CDK inhibitor p21 and reduced the production of Transformation Growth Factor (TGF) β1 and β2. Moreover, oral administration of Tranilast (200 mg/kg) was able to inhibit glioma growth in the 9 L rat glioma model, where cells were implanted intracranially in syngeneic Fisher 344 rats. Tranilast treatment significantly decreased the glioma volume after 10 days [125].

#### 8.4. Digestive cancers

Among the phenolamides, Avns have been reported to exhibit anti-cancer activities against several digestive cancers. Indeed, natural and synthetic Avns can inhibit cell proliferation in several colon (HT29, Caco-2, LS174 T, HCT116), hepatic (HepB3) and pancreatic (PGHAM-1) cancer cell lines [133–135,141,142]. In the Caco-2 and HepB3 cell lines, Avns induced the activation of caspase-8 and -3. Avns were also able to inhibit COX-2 activity and PGE2 production, which could contribute at least partly to the inhibition of proliferation in these cell lines [134,135]. Recently, the combined use of colon cancer cell lines (HCT116, HCT8, DLD1) and colorectal carcinogenesis murine models (azoxymethane/dextran sulphate sodium-induced colorectal cancer, a xenograft tumour model in BALB/c nude mice) led to the identification of at least two molecular mechanisms and signalling pathways by which

AvnA impacts colorectal cancer [136,137]. Indeed, AvnA appeared to activate cellular senescence through the increased expression of the microRNA miR-129-3p, which repressed the expression of the E3 ubiquitin ligase Pirh2 (p53-induced RING-H2), Insulin like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 3 (IGF2BP3) and CDK6. As a consequence of Pirh2 repression, the p53 and p21 protein levels increased inducing cell senescence [137]. In addition, AvnA also inhibited the ATPase activity of DEAD-Box helicase 3 (DDX3) [136], which is involved in the cell invasiveness in several cancer types [143]. The impact of Avns in limiting cancer invasiveness has also been demonstrated through the inhibition of migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumour cells. Indeed, yeast-derived *N*-(*E*)-*p*-coumaroyl-3-hydroxyanthranilic acid and *N*-(*E*)-caffeooyl-3-hydroxyanthranilic acid reduced the expression of the zinc finger protein Snail1 and lymphoid-enhancing factor-1 (LEF-1), which led to a reduction in E-cadherin expression, a major molecule implicated in the EMT process [138]. *N*-trans-feruloyloctopamine also exhibited robust inhibition of cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma cells (HCCM3 and Huh7), and may act *via* the down-regulation of Slug expression and p38 MAPK and Akt phosphorylation [139].

## 9. Phenolamides in cosmetics

In the cosmetics industry, skin whitening products represent an important sector, with an estimation of 15 % of the world population concerned ([www.sironabiochem.com/products/skinlightening](http://www.sironabiochem.com/products/skinlightening)). Skin pigmentation is due to the accumulation of melanin produced by melanocytes in the epidermis. Melanogenesis, the biosynthetic pathway leading to melanin, is quite well-characterised. Tyrosinase is a multi-functional enzyme catalysing the two first steps of melanogenesis, namely the hydroxylation of L-tyrosine to L-DOPA, followed by its oxidation into dopaquinone [144]. This crucial role of tyrosinase in melanogenesis makes it a preferential target to inhibit melanogenesis. Hence, most commercial skin whitening products contain a tyrosinase inhibitor as the active principle. The search for tyrosinase inhibitors of natural origin is an active topic, as highlighted in a recent review by Pillaiyar et al. [145] who listed potentially effective candidates. Among them, many phenolic compounds are mentioned (flavonoids, coumarins, resveratrol derivatives). Although phenolamides were not mentioned, several of them presented tyrosinase inhibitory effects in different assays.

Ethyl acetate and methanol extracts of safflower seeds exhibit strong mushroom tyrosinase inhibitory activity [146]. Feruloylserotonin and *p*-coumaroylserotonin have been shown to be the active compounds in safflower seed extract, with IC<sub>50</sub> values of 23 and 74  $\mu$ M, respectively (Table 4). Both molecules were able to inhibit melanin synthesis in murine B16 melanoma cells with IC<sub>50</sub> values far below the cytotoxic concentration. Serotonin-composed phenolamides have also been highlighted as effective inhibitors of murine and human tyrosinase in a structure-function study comparing 19 structural derivatives [147]. Indeed, serotonin (5-hydro-indole) moieties confer better tyrosinase inhibitor activity than tyramine and tryptamine moieties. The number of hydroxyl groups on the phenolic moieties is also an important factor. This assay identified two compounds, i.e. *N*-trans-caffeooylserotonin and *N*-trans-protocachuooylserotonin, as the most potent tyrosinase inhibitors. Interestingly, *N*-trans-protocachuooylserotonin exerted non-competitive inhibition on tyrosinase activity. Tyramine-composed phenolamides have been screened as human tyrosinase inhibitors. The three best inhibitors are *N*-trans-caffeooyltyramine, *N*-dihydrocaffeooyltyramine and *N*-dihydrocoumaroyltyramine, highlighting once again the importance of hydroxyl groups on the phenolic ring to support this property [148]. The mechanism of action has not been deeply investigated; however, the authors did not find a correlation between antiradical activity and tyrosinase inhibitory capacity, ruling out the possibility that these compounds act as antioxidants against dopaquinone, the final product of tyrosinase. The use of these three

compounds as tyrosinase inhibitors is now under patent [149,150]. Interestingly, *N*-trans-feruloyltyramine was found as the active component in alcoholic extracts of *Enicosanthum membranifolium* branches and *Aurea helianthus* stems, which inhibited melanogenesis in the murine B16 melanoma cell line [151,152]. *N*-trans-feruloyltyramine did not act as an inhibitor of tyrosinase activity but rather reduced tyrosinase accumulation [151]. Melanogenesis inhibition is not restricted to indolic and aromatic monoamine phenolamides. Indeed, polyamine phenolamides from corn bran and the pollen of *Quercus mongolica* also displayed inhibitory activity against mushroom tyrosinase [95,153]. Among the derivatives tested, those bearing a long polyamine chain (spermidine and spermine) with three to four hydroxycinnamic acids exhibited the highest inhibitory activity.

## 10. Bioavailability

Whereas bioavailability and bioaccessibility have been well-documented and reviewed for certain categories of phenolic compounds, including flavanones [154] and phenolic acids [155,156], studies specifically focused on phenolamides are still rare. The bioavailability of Avns is probably the most studied. Indeed, the three major Avns from oat (AvnA, B and C) appear in the blood plasma of human adults 15 min after Avns skim milk supplementation, and reach a peak after 2 h [157]. Interestingly, the occurrence of Avns in plasma was accompanied by an increase in reduced glutathione in blood plasma, which is an important antioxidant component [157]. The bioavailability of AvnA in human blood plasma is 2–5 times higher than that of AvnB and C [157]. The same observation was also made in rat blood plasma [158]. Bioavailability also depends on the organ considered, since AvnB was the major form found in the liver and AvnC was the major form found in skeletal muscles [158]. Metabolites absorbed by the animal or human body are prone to modifications such as conjugation with sulphates or glucuronides, or metabolism by the gut microbiota [159]. Indeed, phenolamides found in the blood plasma and organs of rat fed with Avns or serotonin-derivative phenolamides were mainly in conjugated forms (from 50 % up to 99 %) [20,158]. Interestingly, Wang et al. [160] identified the biotransformed products of AvnC in the mouse and human gut microbiota and demonstrated that one metabolite of AvnC (dihydro AvnC) was more effective than AvnC itself in terms of limiting the proliferation of the human HCT-116 colon cancer cell line [160]. These results highlight the importance of such metabolites and the constituents of the gut microbiota.

## 11. Chemical synthesis and biological production

As for many plant specialized metabolites, phenolamides may constitute a limited resource, due to the fact that they are usually present at low concentrations in plants, or found at high concentrations in very specific organs. Their extraction may lead to low yield and/or need a multi-step process that can be time-consuming and expensive. These findings may constitute a bottleneck to the use of these wide-range bioactive compounds for pharmaceutical applications. Several reports describe possible pathways to their chemical synthesis [109,110,161]. Chemical synthesis is usually regarded as a multi-step and costly process using non-renewable resources. Since the early 2000s, the availability of genetic sequences coding for acyltransferases involved in the biosynthesis of different phenolamide classes has allowed for the development of biotechnological approaches. Indeed, acyltransferases catalyse the last step of phenolamide synthesis, consisting of transferring acyl chains under the form of coA esters (commonly cinnamoyl-coA, *p*-coumaroyl-coA, caffeooyl-coA, feruloyl-coA, sinapoyl-coA) onto the N atom of aromatic monoamines or polyamines. Several transferases have been characterised from plants, usually bearing a specificity for the amine type with more flexibility on the acyl chain. Hence, tyramine-hydroxycinnamoyl-transferase (THT) isolated notably from various Solanaceae is able to synthesise tyramine-associated

Table 5

Summary of the diversity of phenolamide structures that can be produced by metabolic engineering with information on the yield when available. PHE: phenylalanine; TYR: tyrosine; TRP: tryptophan; PHEA: phenylethylamine; PPA: phenylpropylamine; PBA: phenylbutylamine; SPD: spermidine; SPM: spermine; Yav: yeast avenanthramide. When produced from plants, the yield is expressed in  $\mu\text{g. mg}^{-1}$  fresh weight (FW); when produced in microorganisms, the yield is expressed in  $\text{mg.L}^{-1}$  of culture medium.

Organism	Introduced genes	Substrates	Products	Yield	Reference
Rice	<i>CaSHT</i>	-	Feruloylserotonin	200 µg/g FW	[171]
		-	<i>p</i> -coumaroylserotonin	224 µg/g FW	
Tomato	<i>CaSHT</i>	-	Feruloylserotonin	0.6 µg/g FW	[173,
		-	<i>p</i> -coumaroylserotonin	0.1 µg/g FW	175]
	<i>SiTHT</i>	-	<i>p</i> -coumaroyltyramine	0.07 µg/g FW	[174]
		-	Yav1	120 mg/L	[176]
	<i>Nt4CL + CcHCT</i>	-	Yav2	220 mg/L	
		<i>p</i> -coumaric acid + Spd	Di- <i>p</i> -Coumaroylspermidine	-	[181]
		Sinapic acid + Spd	Di-Sinapoylspermidine		
	<i>4CL + AtSCT</i>	<i>p</i> -coumaric acid + Spd	Coumaroylspermidine	-	[181]
		Ferulic acid + Spd	Feruloylspermidine		
	<i>4CL + AtSDT</i>	Ferulic acid + Spd	Di-Feruloylspermidine	-	[181]
		Sinapic acid + Spd	Di-Sinapoylspermidine		
	<i>FjTAL+4CL+HvACT</i>	Sinapic acid + putrescine	Di-Sinapoylputrescine	-	[181]
	<i>FjTAL+4CL + AtSCT</i>	Sinapic acid + Spermine	Di-Sinapoylspermine		
		Agmatine	<i>p</i> -coumaroylagmatine	-	[181]
		-	Di- <i>p</i> -Coumaroylspermidine		
		Caffeic acid + L-dopa	Clovamide	10 mg/L	
		Caffeic acid + L-dopa	Dideoxyclovamide	29 mg/L	
		Caffeic acid + L-dopa	Deoxyclovamide	18 mg/L	
		<i>p</i> -coumaric acid + L-dopa	<i>p</i> -coumaroyl-L-dopa	-	
		Ferulic acid + L-dopa	Feruloyl-L-dopa	-	
		Sinapic acid + L-dopa	Sinapoyl-L-dopa	-	
		Caffeic acid + PHE	Caffeoylphenylalanine	-	
		<i>p</i> -coumaric acid + PHE	<i>p</i> -coumaroylphenylalanine	-	
		Ferulic acid + PHE	Feruloylphenylalanine	-	
		Sinapic acid + PHE	Sinapoylphenylalanine	-	
		Caffeic acid + TYR	Caffeoyltyrosine	-	
		<i>p</i> -coumaric acid + TYR	<i>p</i> -coumaroyltyrosine	-	[177]
		Ferulic acid + TYR	Feruloyltyrosine	-	
		Sinapic acid + TYR	Sinapoyltyrosine	-	
		Fluorocinnamic acid + TYR	Fluorocinnamoyltyrosine	-	
		Trifluoromethylcinnamic acid + TYR	Trifluoromethylcinnamoyltyrosine	-	
		<i>p</i> -coumaric acid + TRP	<i>p</i> -coumaroyltryptophan	-	
		Caffeic acid + TRP	Caffeoyltryptophan	-	
		Ferulic acid + TRP	Feruloyltryptophan	-	
		Sinapic acid + TRP	Sinapoyltryptophan	-	
		<i>p</i> -coumaric acid + ILEU	<i>p</i> -coumaroylsoleucine	-	
		Caffeic acid + ILEU	Caffeoylsoleucine	-	
		Ferulic acid + ILEU	Feruloylsoleucine	-	
		Sinapic acid + ILEU	Sinapoylsoleucine	-	
		<i>p</i> -coumaric acid + PHEA	<i>p</i> -coumaroylphenethylamine	-	
		Caffeic acid + PHEA	Caffeoylphenethylamine	-	
		Ferulic acid + PHEA	Feruloylphenethylamine	-	
		Cinnamic acid + PHEA	Cinnamoylphenethylamine	-	[178]
		3-methoxycinnamic acid + PHEA	3-methoxycinnamoylphenethylamine	-	
		4-methoxycinnamic acid + PHEA	4-methoxycinnamoylphenethylamine	-	
		<i>p</i> -coumaric acid + TYR	<i>p</i> -coumaroylptyramine	-	
		<i>m</i> -coumaric acid + TYR	<i>m</i> -coumaroylptyramine	-	
		<i>o</i> -coumaric acid + TYR	<i>o</i> -coumaroylptyramine	-	
		Caffeic acid + TYR	Caffeoylptyramine	-	
		Ferulic acid + TYR	Feruloylptyramine	-	
		Cinnamic acid + TYR	Cinnamoylptyramine	-	
		3-methoxycinnamic acid + TYR	3-methoxycinnamoyltyramine	-	
		4-methoxycinnamic acid + TYR	4-methoxycinnamoyltyramine	-	
		<i>p</i> -coumaric acid + PHEA	<i>p</i> -coumaroylphenethylamine	-	
		<i>p</i> -coumaric acid + PHEA	<i>p</i> -coumaroylphenethylamine	101.9 mg/L	
		<i>p</i> -coumaric acid + PHEA	<i>p</i> -coumaroylphenethylamine	152.5 mg/L	
		<i>p</i> -coumaric acid + TYR	<i>p</i> -coumaroylptyramine	48.2 mg/L	
		<i>p</i> -coumaric acid + TYR	<i>p</i> -coumaroylptyramine	495.4 mg/L	
		glucose	<i>p</i> -coumaroylptyramine	94.7 mg/L	
E. coli	<i>Os4CL-CaTHT</i>	<i>p</i> -coumaric acid + MetOPHEA	<i>p</i> -coumaroyl- 4- MetOPHEA	-	
		<i>m</i> -coumaric acid + MetOPHEA	<i>m</i> -coumaroyl- 4- MetOPHEA	-	
		<i>o</i> -coumaric acid + MetOPHEA	<i>o</i> -coumaroyl- 4- MetOPHEA	-	
		Caffeic acid + MetOPHEA	Caffeoyl- 4- MetOPHEA	-	
		Ferulic acid + MetOPHEA	Feruloyl- 4- MetOPHEA	-	
		Cinnamic acid + MetOPHEA	Cinnamoyl- 4- MetOPHEA	-	
		3-MeOHcinnamic acid + MetOPHEA	3-MeOHcinnamoyl- 4- MetOPHEA	-	
		4-MeOHcinnamic acid + MetOPHEA	4-MeOHcinnamoyl- 4- MetOPHEA	-	
		<i>Os4CL-CaSHT</i>			[179]

*(continued on next page)*

Table 5 (continued)

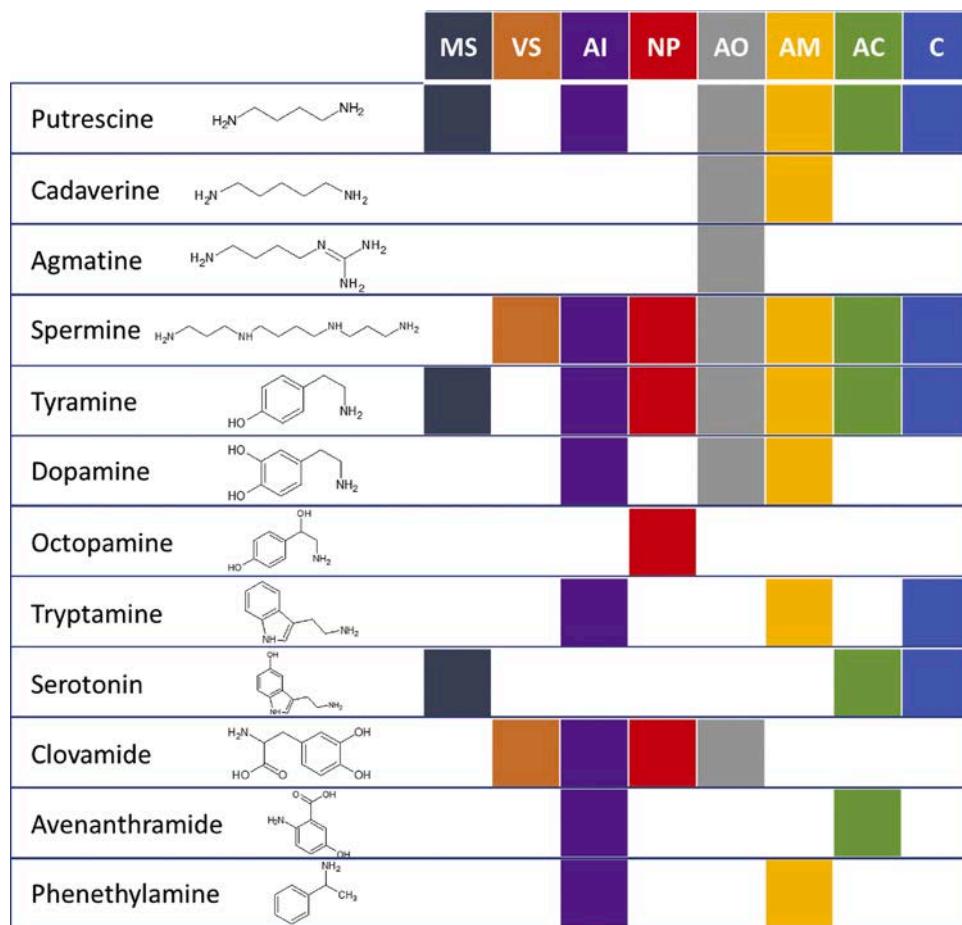
Organism	Introduced genes	Substrates	Products	Yield	Reference
At4CL-CaTHT		2,4-diMetOHcinnamic acid + MetOHPHEA	2,4-DiMetOHcinnamoyl-4-MetOHPHEA	-	
		3,4-diMetOHcinnamic acid + MetOHPHEA	3,4-DiMetOHcinnamoyl-4-MetOHPHEA	-	
		p-coumaric acid + PPA	p-coumaroyl-3-PPA	-	
		m-coumaric acid + PPA	m-coumaroyl-3- PPA	-	
		o-coumaric acid + PPA	o-coumaroyl-3- PPA	-	
		Caffeic acid + PPA	Caffeoyl-3- PPA	-	
		Ferulic acid + PPA	Feruloyl-3- PPA	-	
		Cinnamic acid + PPA	Cinnamoyl-3- PPA	-	
		3-MetOHcinnamic acid + PPA	3-methoxycinnamoyl-3- PPA	-	
		4-MetOHcinnamic acid + PPA	4-methoxycinnamoyl-3- PPA	-	
		2,4-DiMetOHcinnamic	2,4-dimethoxycinnamoyl-3- PPA	-	
		3,4-DiMetOHcinnamic acid + PPA	3,4-dimethoxycinnamoyl-3- PPA	-	
		p-coumaric acid + 4 PBA	p-coumaroyl-4- PBA	-	
		m-coumaric acid + PBA	m-coumaroyl-4- PBA	-	
		o-coumaric acid + PBA	o-coumaroyl-4- PBA	-	
		Caffeic acid + PBA	Caffeoyl-4- PBA	-	
		Ferulic acid + PBA	Feruloyl-4- PBA	-	
		Cinnamic acid + PBA	Cinnamoyl-4- PBA	-	
		3-MetOHcinnamic acid + PBA	3-methoxycinnamoyl-4-PBA	-	
		4-MetOHcinnamic acid + PBA	4-methoxycinnamoyl-4-PBA	-	
		2,4-DiMetOHcinnamic acid + PBA	2,4-dimethoxycinnamoyl-4-PBA	-	
		3,4-DiMetOHcinnamic acid + PBA	3,4-dimethoxycinnamoyl-4-PBA	-	
		p-coumaric acid + tyramine	p-coumaroyltyramine	188 mg/L	
		Ferulic acid + tyramine	Feruloyltyramine	175 mg/L	
		Caffeic acid + tyramine	Caffeoyltyramine	31 mg/L	
		Cinnamic acid + tyramine	Cinnamoyltyramine	2.7 mg/L	[173,
At4CL-CaSHT		p-coumaric acid + dopamine	p-coumaroyldopamine	36 mg/L	175]
		Ferulic acid + dopamine	Feruloyldopamine	48 mg/L	
		Caffeic acid + dopamine	Caffeoyldopamine	34 mg/L	
		Cinnamic acid + dopamine	Cinnamoyldopamine	0.67 mg/L	
		p-coumaric acid + serotonin	p-coumaroylserotonin	215 mg/L	
		p-coumaric acid + Octopamine	p-coumaroyloctopamine	208 mg/L	
Lactococcus lactis	At4CL-TpHDT1	p-coumaric acid + tyramine	p-coumaroyltyramine	187 mg/L	
		Caffeic acid + serotonin	Caffeoylserotonin	11 mg/L	[180]
		Ferulic acid + serotonin	Feruloylserotonin	96 mg/L	
		Cinnamic acid + serotonin	Cinnamoylserotonin	39 mg/L	
		Sinapic acid + serotonin	Sinapoylserotonin	1 mg/L	
		p-coumaric acid + TYR	Dideoxyclovamide	0.33 mg/L	[177]

phenolamides with coumaroyl-coA or feruloyl-coA [162–165]. Other transferases like serotonin-hydroxycinnamoyl-transferase (SHT), agmatine-hydroxycinnamoyl-transferase and spermidine-hydroxycin namoyl-transferase have been characterised and cloned from different plant species [7,12,15,166–170]. This catalogue of hydroxycinnamoyl transferases, together with their flexibility regarding the acyl donor origin, allows *a priori* the possibility to synthesise a large array of phenolamides.

The impact of overexpressing acyltransferases on phenolamide accumulation has been investigated in several plant models with contrasting results. Indeed, neither the overexpression of the pepper SHT in rice, nor the overexpression of the endogenous THT of tobacco led to the expected constitutive accumulation of serotonin- and tyramine-associated phenolamides [171,172]. In the case of the transgenic plants overexpressing the pepper SHT, addition of tyramine to the culture medium led to an increase in phenolamide accumulation in comparison to the wild type plant. This supports the idea that the endogenous concentrations of serotonin and tyramine could constitute a bottleneck. Accordingly, the overexpression of pepper SHT and tomato THT in tomato plants, known to accumulate high concentrations of endogenous tyramine and serotonin, increased the constitutive accumulation of phenolamides by a factor 2–10 [173,174]. Nevertheless, with this strategy, the accumulation level of phenolamides remains too low (from ng/g to hundred µg/g of fresh weight) to envision using them as a production platform (Table 5).

Phenolamide production has been investigated through metabolic

engineering in micro-organisms *i.e.* yeast and bacteria. Microorganisms are unable to produce hydroxycinnamoyl-coA esters. The plant specific 4-coumarate-coA ligase (4CL) catalyses the formation of the hydroxycinnamoyl-coA esters from hydroxycinnamic acids and coenzyme A. Co-expression of 4CL and acyltransferases was successfully developed to produce a high diversity of phenolamides in microorganisms. In yeast (*S. cerevisiae*), Moglia et al. (2010, [184,176]) developed a strain coexpressing 4CL2 from tobacco and hydroxycinnamoyl coA transferase from globe artichoke (HCT) producing anthranilate-based phenolamides from phenolic acids and anthranilate supplemented to the growth medium. Using the same strategy, Eudes et al. [181] built up yeast strains able to produce agmatine, putrescine, spermidine and spermine derivatives. More recently, Bouchez et al. [177] reported on the production of clovamide and its derivatives by a yeast strain co-expressing 4CL5 from *Arabidopsis thaliana* and hydroxycinnamoyl-CoA: L-3,4-dihydroxyphenylalanine hydroxycinnamoyl transferase (HDT) from clover. Interestingly, depending on the acyl donors and acceptors added to the cell culture medium, the strain could synthesise up to 22 different phenolamides. The same genes were also successfully expressed in the bacterial strain *Lactococcus lactis* [177]. The bacteria *E. coli* has been also used for the production of tyramine-, serotonin- and phenethylamine-based phenolamides with strains co-expressing 4CL and either SHT [178–180] or THT [175,178]. As for the yeast system, the *E. coli* expression system has the advantage of directly producing the molecule of interest in the culture medium, but with higher production levels than with yeast. In addition, in order to



**Fig. 3. Summary of phenolamide bioactivities according to their amine moiety.** For each phenolamide class, colours indicate that at least one structure has been reported for the related bioactivity. MS: metabolic syndrome; VS: vascular system; AL: anti-inflammatory; NP: neuroprotection; AO: antioxidant; AM: antimicrobial; AC: anticancer; C: cosmetic.

avoid the addition of the substrate (phenolic acids and amines) into the culture medium, Sim et al. [178] built up a strain combining the over-expression of 4CL and THT together with a tyrosine decarboxylase (TDC) and a tyrosine ammonia lyase (TAL), which led to the production of endogenous tyramine and p-coumaric acid from tyrosine. As a consequence, this strain was able to produce *p*-coumaroyl-tyramine directly from glucose.

## 12. Conclusions

Since their first discovery as bioactive compounds in the 1970s [19, 45], phenolamides have been of interest in a pharmacological context. Indeed, our review led us to identify about 100 phenolamide structures exhibiting activity. Ranking these structures based on their amine moieties shows that some of them (putrescine, spermidine, tyramine derivatives and clovamide) have been successfully characterised regarding a broad panel of bioactivities (Fig. 3), whereas others exhibited more specific bioactivities (or have been assayed and only specific bioactivities have been reported). Phenolamide structural diversity is far broader than the actual reported structures, since theoretical structure generation based on the most common phenolic and amines moieties can reach several hundreds [5]. Therefore, the potential to discover new bioactivities among this family of metabolites is huge. Increased research efforts to prospect their bioactivity is fully justified by the major associated issues, in terms of human and plant health.

## Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

## References

- [1] J. Martin-Tanguy, F. Cabanne, E. Perdrizet, C. Martin, The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants, *Phytochemistry* 17 (1978) 1927–1928.
- [2] K. Herrmann, C.W. Nagel, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28 (1989) 315–347.
- [3] S. Bienz, P. Bisegger, A. Guggisberg, M. Hesse, Polyamine alkaloids, *Nat. Prod. Rep.* 22 (2005) 647–658.
- [4] J.-E. Bassard, P. Ullmann, F. Bernier, D. Werck-Reichhart, Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism, *Phytochemistry* 71 (2010) 1808–1824.
- [5] Z. Li, C. Zhao, X. Zhao, Y. Xia, X. Sun, W. Xie, Y. Ye, X. Lu, G. Xu, Deep annotation of hydroxycinnamic acid amides in plants based on ultra-high-Performance liquid chromatography–High-Resolution mass spectrometry and its in Silico Database, *Anal. Chem.* 90 (2018) 14321–14330.
- [6] Y.-Y. Li, H. Wang, C. Zhao, Y.-Q. Huang, X. Tang, H.-Y. Cheung, Identification and characterization of kukoamine metabolites by multiple ion monitoring triggered enhanced product ion scan method with a triple-quadrupole linear ion trap mass spectrometer, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 10785–10790.
- [7] J. Luo, C. Fuell, A. Parr, L. Hill, P. Bailey, K. Elliott, S.A. Fairhurst, C. Martin, A. J. Michael, A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in *Arabidopsis* seed, *Plant Cell* 21 (2009) 318–333.
- [8] H. Kaur, N. Heinzel, M. Schoettner, I.T. Baldwin, I. Galis, R2R3-NaMYB8 regulates the accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates, which are essential for local and systemic defense against insect herbivores in *Nicotiana attenuata*, *Plant Physiol.* 152 (2010) 1731–1747.
- [9] X. Dong, Y. Gao, W. Chen, W. Wang, L. Gong, X. Liu, J. Luo, Spatiotemporal distribution of Phenolamides and the genetics of natural variation of hydroxycinnamoyl spermidine in rice, *Mol. Plant* 8 (2015) 111–121.

- [10] E. Grienberger, S. Besseau, P. Geoffroy, D. Debayle, D. Heintz, C. Lapierre, B. Pollet, T. Heitz, M. Legrand, A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines, *Plant J.* 58 (2009) 246–259.
- [11] T. Vogt, Unusual spermine-conjugated hydroxycinnamic acids on pollen: function and evolutionary advantage, *J. Exp. Bot.* 69 (2018) 5311–5315.
- [12] M. Delporte, G. Bernard, G. Legrand, B. Hielscher, A. Lanoue, R. Molinié, C. Rambaud, D. Mathiron, S. Besseau, N. Linka, J.-L. Hilbert, D. Gagneul, A BAHD neofunctionalization promotes tetrahydroxycinnamoyl spermine accumulation in the pollen coats of the Asteraceae family, *J. Exp. Bot.* (2018).
- [13] E. von Roepenack-Lahaye, M.-A. Newman, S. Schornack, K.E. Hammond-Kosack, T. Lahaye, J.D.G. Jones, M.J. Daniels, J.M. Dow, P-coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43373–43383.
- [14] L. Zácarés, M.P. López-Gresa, J. Fayos, J. Primo, J.M. Bellés, V. Conejero, Induction of p-Coumaroyldopamine and Feruloyldopamine, Two Novel Metabolites, in Tomato by the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 20 (2007) 1439–1448.
- [15] N. Onkokesung, E. Gaquerel, H. Kotkar, H. Kaur, I.T. Baldwin, I. Galis, MYB8 controls inducible phenolamide levels by activating three novel hydroxycinnamoyl-coenzyme a:polyamine transferases in *Nicotiana attenuata*, *Plant Physiol.* 158 (2012) 389–407.
- [16] M.P. López-Gresa, F. Maltese, J.M. Bellés, V. Conejero, H.K. Kim, Y.H. Choi, R. Verpoorte, Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions, *Phytochem. Anal.* 21 (2010) 89–94.
- [17] K.M. Alamgir, Y. Hojo, J.T. Christeller, K. Fukumoto, R. Isshiki, T. Shinya, I. T. Baldwin, I. Galis, Systematic analysis of rice (*Oryza sativa*) metabolic responses to herbivory, *Plant Cell Environ.* 39 (2016) 453–466.
- [18] C. Fellenberg, C. Böttcher, T. Vogt, Phenylpropanoid polyamine conjugate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* flower buds, *Phytochemistry* 70 (2009) 1392–1400.
- [19] S. Funayama, K. Yoshida, C. Konno, H. Hikino, Structure of kukoamine A, a hypotensive principle of *Lycium chinense* root barks1, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 1355–1356.
- [20] N. Koyama, K. Kurabayashi, T. Seki, K. Kobayashi, Y. Furuhata, K. Suzuki, H. Arisaka, T. Nakano, Y. Amino, K. Ishii, Serotonin derivatives, major safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed antioxidants, inhibit low-density lipoprotein (LDL) oxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-Deficient mice, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4970–4976.
- [21] Z. Long, Y. Zhang, Z. Guo, L. Wang, X. Xue, X. Zhang, S. Wang, Z. Wang, O. Civelli, X. Liang, Amide alkaloids from *Scopolia tangutica*, *Planta Med.* 80 (2014) 1124–1130.
- [22] D. Qian, Y. Zhao, G. Yang, L. Huang, Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae), *Molecules* 22 (2017) 911.
- [23] P.-F. Zhu, Z. Dai, B. Wang, X. Wei, H.-F. Yu, Z.-R. Yan, X.-D. Zhao, Y.-P. Liu, X.-D. Luo, The anticancer activities phenolic amides from the stem of *Lycium barbarum*, *Nat. Prod. Bioprospecting* 7 (2017) 421–431.
- [24] Z. Xia, T. Xu, W. Xu, H. Zhang, Q. Liang, G. Zhou, Lycyunin, a new dimer of feruloyltyramine and five bioactive tyramines from the root of *Lycium yunnanense* Kuang, *Nat. Prod. Res.* (2019).
- [25] P.-F. Zhu, Y.-L. Zhao, Z. Dai, X.-J. Qin, H.-L. Yuan, Q. Jin, Y.-F. Wang, Y.-P. Liu, X.-D. Luo, Phenolic amides with immunomodulatory activity from the nonpolysaccharide fraction of *Lycium barbarum* fruits, *J. Agric. Food Chem.* 68 (2010) 3079–3087.
- [26] R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, The metabolic syndrome, *Lancet* 365 (2005) 1415–1428.
- [27] S. Mottillo, K.B. Filion, J. Genest, L. Joseph, L. Pilote, P. Poirier, S. Rincret, E. L. Schiffrin, M.J. Eisenberg, The metabolic syndrome and cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis, *J. Am. Coll. Cardiol.* 56 (2010) 1113–1132.
- [28] S. Moreno-Fernández, M. Garcés-Rimón, G. Vera, J. Astier, J.F. Landrier, M. Miguel, High Fat/High glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model, *Nutrients* (2018) 10.
- [29] Y. Yamazaki, Y. Kawano, M. Uebayasi, Induction of adiponectin by natural and synthetic phenolamides in mouse and human preadipocytes and its enhancement by docosahexaenoic acid, *Life Sci.* 82 (2008) 290–300.
- [30] T. Nishioka, J. Watanabe, J. Kawabata, R. Niki, Isolation and activity of N-p-Coumaroyltyramine, an  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor in welsh onion (*Allium fistulosum*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 1138–1141.
- [31] T. Niwa, U. Doi, T. Osawa, Inhibitory activity of corn-derived bisamide compounds against  $\alpha$ -Glucosidase, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 90–94.
- [32] Y.H. Song, D.W. Kim, M.J. Curtiss-Long, C. Park, M. Son, J.Y. Kim, H.J. Yuk, K. W. Lee, K.H. Park, Cinnamyl acid amides from *Tribulus terrestris* displaying uncompetitive  $\alpha$ -glucosidase inhibition, *Eur. J. Med. Chem.* 114 (2016) 201–208.
- [33] Y.-Y. Li, D.A. Stewart, X.-M. Ye, L.-H. Yin, W.W. Pathmasiri, S.L. McRitchie, T. R. Fennell, H.-Y. Cheung, S.J. Sumner, A metabolomics approach to investigate kukoamine B—a potent natural product with anti-diabetic properties, *Front. Pharmacol.* (2019) 9.
- [34] M.-A. Cornier, D. Dabelea, T.L. Hernandez, R.C. Lindstrom, A.J. Steig, N.R. Stob, R.E. Van Pelt, H. Wang, R.H. Eckel, The metabolic syndrome, *Endocr. Rev.* 29 (2008) 777–822.
- [35] S.-S. Tsai, Y.-Y. Chu, S.-T. Chen, P.-H. Chu, A comparison of different definitions of metabolic syndrome for the risks of atherosclerosis and diabetes, *Diabetol. Metab. Syndr.* 10 (2018) 56.
- [36] E. Galkina, K. Ley, Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. Annual Review of Immunology (Annual Reviews: Palo Alto), 2009, pp. 165–197.
- [37] S. Katsuda, K. Suzuki, N. Koyama, M. Takahashi, M. Miyake, A. Hazama, K. Takazawa, Safflower seed polyphenols (*N*-(*p*-coumaroyl)serotonin and *N*-feruloylserotonin) ameliorate atherosclerosis and distensibility of the aortic wall in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic (KHC) rabbits, *Hypertens. Res.* 32 (2009) 944–949.
- [38] N. Koyama, K. Suzuki, Y. Furukawa, H. Arisaka, T. Seki, K. Kurabayashi, K. Ishii, E. Sukegawa, M. Takahashi, Effects of safflower seed extract supplementation on oxidation and cardiovascular risk markers in healthy human volunteers, *Br. J. Nutr.* 101 (2008) 568–575.
- [39] R. Piga, Y. Naito, S. Kokura, O. Handa, T. Yoshikawa, Inhibitory effect of serotonin derivatives on high glucose-induced adhesion and migration of monocytes on human aortic endothelial cells, *Br. J. Nutr.* 102 (2009) 264–272.
- [40] T. Takimoto, K. Suzuki, H. Arisaka, T. Murata, H. Ozaki, N. Koyama, Effect of *N*-(*p*-coumaroyl)serotonin and *N*-feruloylserotonin, major anti-atherogenic polyphenols in safflower seed, on vasodilation, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 55 (2011) 1561–1571.
- [41] L. Liu, L. Zubik, F.W. Collins, M. Marko, M. Meydani, The antithrombotic potential of oat phenolic compounds, *Atherosclerosis* 175 (2004) 39–49.
- [42] J.B. Park, Isolation and characterization of N-Feruloyltyramine as the P-Selectin expression suppressor from garlic (*Allium sativum*), *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 8868–8872.
- [43] J.B. Park, Bocatamide found in *Houttuynia cordata* suppresses P-selectin expression via inhibiting COX enzyme, not increasing cAMP in platelets, *Phytother. Res.* 29 (2015) 1381–1387.
- [44] J.B. Park, Bioavailability of Alfrutamide and Caffedymine and their P-Selectin suppression and platelet -Leukocyte aggregation mechanisms in mice, *J. Nutr.* 146 (2016) 437S–443S.
- [45] F. Dorer, J. Kahn, K. Lentz, M. Levine, L. Skeggs, Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting enzyme, *Circ. Res.* 34 (1974) 824–827.
- [46] D.P. Forero, C. Masatani, Y. Fujimoto, E. Coy-Barrera, D.G. Peterson, C. Osorio, Spermidine Derivatives in Lulo (*Solanum quitoense* lam.) fruit: sensory (taste) versus biofunctional (ACE-Inhibition) properties, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 5375–5383.
- [47] T. Yoshihara, H. Yoshikawa, S. Sakamura, T. Sakuma, Clovamides; l-Dopa Conjugated with trans- and cis-Caffeic Acids in Red Clover (*Trifolium pratense*), *Agric. Biol. Chem.* 38 (1974) 1107–1109.
- [48] A. Zamperone, S. Pietronave, D. Colangelo, S. Antonini, M. Locatelli, F. Travaglia, J.D. Coissón, M. Arlorio, M. Prat, Protective effects of clovamide against H2O2-induced stress in rat cardiomyoblasts H9c2 cell line, *Food Funct.* 5 (2014) 2542–2551.
- [49] M. Chiong, Z.V. Wang, Z. Pedrozo, D.J. Cao, R. Troncoso, M. Ibacache, A. Criollo, A. Nemchenko, J.A. Hill, S. Lavandero, Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications, *Cell Death Dis.* 2 (2011) e244.
- [50] J. Kolodziejczyk, B. Olas, B. Wachowicz, B. Szajwaj, A. Stochmal, W. Oleszek, Clovamide-rich extract from *Trifolium pallidum* reduces oxidative stress-induced damage to blood platelets and plasma, *J. Physiol. Biochem.* 67 (2011) 391–399.
- [51] R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation, *Nature* 454 (2008) 428–435.
- [52] M.E. Kotas, R. Medzhitov, Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility, *Cell* 160 (2015) 816–827.
- [53] M.Y. Donath, S.E. Shoelson, Type 2 diabetes as an inflammatory disease, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 98–107.
- [54] A. Taube, R. Schilich, H. Sell, K. Eckardt, J. Eckel, Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases, *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 302 (2012) H2148–H2165.
- [55] H.T. Lu, W.M. Ouyang, C.S. Huang, Inflammation, a key event in cancer development, *Mol. Cancer Res.* 4 (2006) 221–233.
- [56] G. Trinchieri, Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts, *Annu. Rev. Immunol.* 30 (2012) 677–706.
- [57] E.C. Hirsch, S. Hunot, Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8 (2009) 382–397.
- [58] N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar, The immunomodulatory and anti-inflammatory role of phenolphenols, *Nutrients* 10 (2018) 1618.
- [59] E.O. Kim, K.J. Min, T.K. Kwon, B.H. Um, R.A. Moreau, S.W. Choi, Anti-inflammatory activity of hydroxycinnamic acid derivatives isolated from corn bran in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages, *Food Chem.* 150 (2012) 1309–1316.
- [60] Y. Jiang, L. Yu, M.-H. Wang, N-trans-feruloyltyramine inhibits LPS-induced NO and PGE2 production in RAW 264.7 macrophages: involvement of AP-1 and MAP kinase signalling pathways, *Chem. Biol. Interact.* 235 (2015) 56–62.
- [61] S. Wang, J.H. Suh, X. Zheng, Y. Wang, C.-T. Ho, Identification and quantification of potential anti-inflammatory hydroxycinnamic acid amides from wolfberry, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 364–372.
- [62] H.S. Kim, J.W. Lee, H. Jang, T.P.L. Le, J.G. Kim, M.S. Lee, J.T. Hong, M.K. Lee, B. Y. Hwang, Phenolic amides from *Tribulus terrestris* and their inhibitory effects on nitric oxide production in RAW 264.7 cells, *Arch. Pharm. Res.* 41 (2018) 192–195.
- [63] S. Wang, J.H. Suh, W.-L. Hung, X. Zheng, Y. Wang, C.-T. Ho, Use of UHPLC-TripleQ with synthetic standards to profile anti-inflammatory hydroxycinnamic acid amides in root barks and leaves of *Lycium barbarum*, *J. Food Drug Anal.* 26 (2018) 572–582.
- [64] C. Hu, Y. Tang, Y. Zhao, S. Sang, Quantitative analysis and anti-inflammatory activity evaluation of the A-Type avenanthramides in commercial sprouted oat products, *J. Agric. Food Chem.* (2019).

- [65] L. Wang, P. Wang, D. Wang, M. Tao, W. Xu, O.J. Olatunji, Anti-inflammatory activities of kukoamine a from the root bark of *Lycium chinense* miller, *Nat. Prod. Commun.* (2020) 15.
- [66] Y.-T. Lee, Y.-L. Hsieh, Y.-H. Yeh, C.-Y. Huang, Synthesis of phenolic amides and evaluation of their antioxidant and anti-inflammatory activity in vitro and in vivo, *RSC Adv.* 5 (2015) 85806–85815.
- [67] E.H. Han, J.Y. Kim, H.G. Kim, J.H. Choi, J.H. Im, E.R. Woo, H.G. Jeong, Dihydro-N-caffeoyletyramine down-regulates cyclooxygenase-2 expression by inhibiting the activities of C/EBP and AP-1 transcription factors, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 579–586.
- [68] L.-W. Xie, A.G. Atanasov, D.-A. Guo, C. Malainer, J.-X. Zhang, M. Zehl, S.-H. Guan, E.H. Heiss, E. Urban, V.M. Dirsch, B. Kopp, Activity-guided isolation of NF-κB inhibitors and PPAR $\gamma$  agonists from the root bark of *Lycium chinense* Miller, *J. Ethnopharmacol.* 152 (2014) 470–477.
- [69] D. Yeo, C. Kang, T. Zhang, L.L. Ji, Avenanthramides attenuate inflammation and atrophy in muscle cells, *J. Sport Health Sci.* 8 (2019) 189–195.
- [70] C. Kang, W.S. Shin, D. Yeo, W. Lim, T. Zhang, L.L. Ji, Anti-inflammatory effect of avenanthramides via NF-κB pathways in C2C12 skeletal muscle cells, *Free Radic. Biol. Med.* 117 (2018) 30–36.
- [71] C. Kang, W.S. Shin, D. Yeo, W. Lim, L.L. Ji, Data on the mode of binding between avenanthramides and IKK $\beta$  domains in a docking model, *Data Brief* 17 (2018) 994–997.
- [72] H. Zeng, M. Locatelli, C. Bardelli, A. Amoruso, J.D. Coisson, F. Travaglia, M. Arlorio, S. Brunelleschi, Anti-inflammatory properties of clovamide and Theobroma cacao phenolic extracts in human monocytes: evaluation of respiratory burst, cytokine release, NF-κB activation, and PPAR $\gamma$  modulation, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 5342–5350.
- [73] E.S. Kurtz, W. Wallo, Colloidal oatmeal: history, chemistry and clinical properties, *J. Drugs Dermatol. JDD* 6 (2007) 167–170.
- [74] H. Inoue, H. Ohshima, H. Kono, M. Yamanaka, T. Kubota, M. Aihara, T. Hiroi, N. Yago, H. Ishida, Suppressive effects of tranilast on the expression of inducible cyclooxygenase (COX2) in interleukin-1 $\beta$ -stimulated fibroblasts, *Biochem. Pharmacol.* 53 (1997) 1941–1944.
- [75] R. Sur, A. Nigam, D. Grote, F. Liebel, M.D. Southall, Avenanthramides, polyphenols from oats, exhibit anti-inflammatory and anti-itch activity, *Arch. Dermatol. Res.* 300 (2008) 569–574.
- [76] T. Lotts, K. Agelopoulos, N.Q. Phan, K. Loser, G. Schmaus, T.A. Luger, S. Ständer, Dihydroavenanthramide D inhibits mast cell degranulation and exhibits anti-inflammatory effects through the activation of neurokinin-1 receptor, *Exp. Dermatol.* 26 (2017) 739–742.
- [77] H. Dhakal, E.-J. Yang, S. Lee, M.-J. Kim, M.-C. Baek, B. Lee, P.-H. Park, T. K. Kwon, D. Khang, K.-S. Song, S.-H. Kim, Avenanthramide C from germinated oats exhibits anti-allergic inflammatory effects in mast cells, *Sci. Rep.* 9 (2019) 6884.
- [78] S. Darakhshan, A.B. Pour, Tranilast: a review of its therapeutic applications, *Pharmacol. Res.* 91 (2015) 15–28.
- [79] H. Chen, H. Yoshioka, G.S. Kim, J.E. Jung, N. Okami, H. Sakata, C.M. Maier, P. Narasimhan, C.E. Goeders, P.H. Chan, Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection, *Antioxid. Redox Signal.* 14 (2011) 1505–1517.
- [80] W.-W. Chen, X. Zhang, W.-J. Huang, Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review), *Mol. Med. Rep.* 13 (2016) 3391–3396.
- [81] E. Singh, G. Devasahayam, Neurodegeneration by oxidative stress: a review on prospective use of small molecules for neuroprotection, *Mol. Biol. Rep.* 47 (2020) 3133–3140.
- [82] S. Fallarini, G. Miglio, T. Paoletti, A. Minassi, A. Amoruso, C. Bardelli, S. Brunelleschi, G. Lombardi, Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in vitro models of neuronal death, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 1072–1084.
- [83] H.-W. Lim, J.-I. Park, S.V. More, J.-Y. Park, B.-W. Kim, S.-B. Jeon, Y. Yun, E.-J. Park, S.-H. Yoon, D.-K. Choi, Anti-neuroinflammatory effects of DPTP, a novel synthetic clovamide derivative in vitro and in vivo model of neuroinflammation, *Brain Res. Bull.* 112 (2015) 25–34.
- [84] X.-L. Hu, J. Lin, X.-Y. Lv, J.-H. Feng, X.-Q. Zhang, H. Wang, W.-C. Ye, Synthesis and biological evaluation of clovamide analogues as potent anti-neuroinflammatory agents in vitro and in vivo, *Eur. J. Med. Chem.* 151 (2018) 261–271.
- [85] J.-Y. Park, B.-W. Kim, H.U. Lee, D.-K. Choi, S.-H. Yoon, Synthesis of clovamide analogues that inhibit NO production in activated BV-2 microglial cells, *Biol. Pharm. Bull.* 40 (2017) 1475–1482.
- [86] X.-L. Hu, L.-Y. Gao, Y.-X. Niu, X. Tian, J. Wang, W.-H. Meng, Q. Zhang, C. Cui, L. Han, Q.-C. Zhao, Neuroprotection by Kukoamine A against oxidative stress may involve N-methyl-d-aspartate receptors, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1850 (2015) 287–298.
- [87] L.-Q. Wang, Y. Wang, S.-Y. Gao, L.-H. Zhu, F. Wang, H. Li, L.-X. Chen, Phenolic amides with anti-Parkinson's disease (PD) effects from Nicandra physaloides, *J. Funct. Foods* 31 (2017) 229–236.
- [88] X. Hu, Q. Song, X. Li, D. Li, Q. Zhang, W. Meng, Q. Zhao, Neuroprotective effects of Kukoamine A on neurotoxin-induced Parkinson's model through apoptosis inhibition and autophagy enhancement, *Neuropharmacology* 117 (2017) 352–363.
- [89] J.-H. Feng, X.-L. Hu, X.-Y. Lv, B.-L. Wang, J. Lin, X.-Q. Zhang, W.-C. Ye, F. Xiong, H. Wang, Synthesis and biological evaluation of clovamide analogues with catechol functionality as potent Parkinson's disease agents in vitro and in vivo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 29 (2019) 302–312.
- [90] K. Iijima, H.-P. Liu, A.-S. Chiang, S.A. Hearn, M. Konsolaki, Y. Zhong, Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 6623–6628.
- [91] T. Tully, W.G. Quinn, Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*, *J. Comp. Physiol. [A]* 157 (1985) 263–277.
- [92] Z.-Q. Zhou, H.-X. Fan, R.-R. He, J. Xiao, B. Tsoi, K.-H. Lan, H. Kurihara, K.-F. So, X.-S. Yao, H. Gao, Lyciobarbispermidines a–O, new dicaffeoylspermidine derivatives from wolfberry, with activities against Alzheimer's disease and oxidation, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 2223–2237.
- [93] C.-H. Li, J.-L. Yang, Wolfberry extracts inhibit A $\beta$ 1-42 aggregation and rescue memory loss of AD drosophila, *Food Sci. Hum. Wellness* 9 (2020) 64–70.
- [94] V.S. Ramasamy, M. Samidurai, H.J. Park, M. Wang, R.Y. Park, S.Y. Yu, H.K. Kang, S. Hong, W.-S. Choi, Y.Y. Lee, H.-S. Kim, J. Jo, Avenanthramide-C restores impaired plasticity and cognition in Alzheimer's disease model mice, *Mol. Neurobiol.* 57 (2020) 315–330.
- [95] S.W. Choi, S.K. Lee, E.O. Kim, J.H. Oh, K.S. Yoon, N. Parris, K.B. Hicks, R. A. Moreau, Antioxidant and antimelanogenic activities of polyamine conjugates from corn bran and related hydroxycinnamic acids, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3920–3925.
- [96] J.-Y. Choi, H. Kim, Y.-J. Choi, A. Ishihara, K. Back, S.-G. Lee, Cytoprotective activities of hydroxycinnamic acid amides of serotonin against oxidative stress-induced damage in HepG2 and HaCaT cells, *Fitoterapia* 81 (2010) 1134–1141.
- [97] K. Gao, D. Ma, Y. Cheng, X. Tian, Y. Lu, X. Du, H. Tang, J. Chen, Three new dimers and two monomers of phenolic amides from the fruits of *Lycium barbarum* and their antioxidant activities, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 1067–1075.
- [98] K. Abe, H. Matsura, M. Ukai, H. Shimura, H. Koshino, T. Suzuki, N-1, N-14-diferuloylsperrmine as an antioxidant phytochemical contained in leaves of *Cardamine fauriei*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81 (2017) 1855–1860.
- [99] X.-L. Xin, et al., Phenylpropanoid amides from *Alisma orientalis* and their protective effects against H2O2-induced damage in SH-SY5Y cells, *Phytochem. Lett.* 21 (2017) 46–50.
- [100] S. Spreng, T. Hofmann, Activity-guided identification of in vitro antioxidants in beer, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 720–731.
- [101] D. Hadjipavlou-Litina, T. Garnelis, C.M. Athanassopoulos, D. Papaioannou, Kukoamine A analogs with lipoxygenase inhibitory activity, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24 (2009) 1188–1193.
- [102] C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, G. Paganga, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 933–956.
- [103] G.-C. Yen, C.-L. Hsieh, Antioxidant effects of dopamine and related compounds, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 1646–1649.
- [104] H.C. Ha, N.S. Sirisoma, P. Kuppusamy, J.L. Zweier, P.M. Woster, R.A. Casero, The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 11140–11145.
- [105] M.M. Kabanda, A theoretical study of the antioxidant properties of phenolic acid amides investigated through the radical-scavenging and metal chelation mechanisms, *Eur. Food Res. Technol.* 241 (2015) 553–572.
- [106] X. Li, J. Lin, B. Chen, H. Xie, D. Chen, Antioxidant and cytoprotective effects of kukoamines A and B: comparison and positional isomeric effect, *Molecules* 23 (2018) 973.
- [107] L. Georgiev, M. Chochkova, G. Ivanova, H. Najdenski, M. Ninova, T. Milkova, Radical Scavenging and Antimicrobial Activities of Cinnamoyl Amides of Biogenic Monoamines, *ResearchGate*, 2012.
- [108] R.E. Duval, M. Grare, Fight against antimicrobial resistance: we always need new antibacterials but for right Bacteria, *Molecules* 24 (2019) 3152.
- [109] B. Yingyongnarongkul, N. Apiratikul, N. Aroonrerk, A. Suksamrarn, Solid-phase synthesis and antibacterial activity of hydroxycinnamic acid amides and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 5870–5873.
- [110] B. Yingyongnarongkul, N. Apiratikul, N. Aroonrerk, A. Suksamrarn, Synthesis of bis, tris and tetra(dihydrocafeoyl)polyamine conjugates as antibacterial agents against VRSA, *Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 698–704.
- [111] D.G. Lee, Y. Park, M.-R. Kim, H.J. Jung, Y.B. Seu, K.-S. Nahm, E.-R. Woo, Antifungal effects of phenolic amides isolated from the root bark of *Lycium chinense*, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 1125–1130.
- [112] A. Mocan, L. Vlase, D.C. Vodnar, C. Bischin, D. Hanganu, A.-M. Gheldiu, R. Oprean, R. Silaghi-Dumitrescu, G. Crisan, Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. And *Lycium chinense* mill, *Leaves. Molecules* 19 (2014) 10056–10073.
- [113] S. Michalet, G. Cartier, B. David, A.-M. Mariotte, M.-G. Dijoux-franca, G.W. Kaatz, M. Stavri, S. Gibbons, N-Caffeoylphenylalanylamine derivatives as bacterial efflux pump inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 1755–1758.
- [114] P.C. Hsieh, S.A. Siegel, B. Rogers, D. Davis, K. Lewis, Bacteria lacking a multidrug pump: a sensitive tool for drug discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 6602–6606.
- [115] E. Jagu, S. Pomel, S. Pethe, P.M. Loiseau, R. Labruère, Polyamine-based analogs and conjugates as antikinetoplastid agents, *Eur. J. Med. Chem.* 139 (2017) 982–1015.
- [116] J.A. Ponasik, C. Strickland, C. Faerman, S. Savvides, P.A. Karplus, B. Ganem, Kukoamine A and other hydrophobic acylpolyamines: potent and selective inhibitors of *Crithidia fasciculata* trypanothione reductase, *Biochem. J.* 311 (1995) 371–375.
- [117] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424.

- [118] Y.M. Coyle, The effect of environment on breast cancer risk, *Breast Cancer Res. Treat.* 84 (2004) 273–288.
- [119] M.E. Hochberg, R.J. Noble, A framework for how environment contributes to cancer risk, *Ecol. Lett.* 20 (2017) 117–134.
- [120] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2020, *CA Cancer J. Clin.* 70 (2020) 7–30.
- [121] L. Rocha, M. Monteiro, A. Teodoro, Anticancer properties of hydroxycinnamic acids -A review, *Cancer Clin. Oncol.* 1 (2012) 109.
- [122] D. Lazar, G.A. Alexiou, G.S. Markopoulos, E. Vartholomatos, E. Hodaj, I. Chousidis, I. Leonardos, V. Galani, A.P. Kyritsis, N-(p-coumaroyl) serotonin inhibits glioblastoma cells growth through triggering S-phase arrest and apoptosis, *J. Neurooncol.* 132 (2017) 373–381.
- [123] G.A. Alexiou, D. Lazar, G. Markopoulos, E. Vartholomatos, E. Hodaj, V. Galani, A. P. Kyritsis, Moschamine inhibits proliferation of glioblastoma cells via cell cycle arrest and apoptosis, *Tumor Biol.* 39 (2017), 705744.
- [124] Q. Wang, H. Li, Z. Sun, L. Dong, L. Gao, C. Liu, X. Wang, Kukoamine A inhibits human glioblastoma cell growth and migration through apoptosis induction and epithelial-mesenchymal transition attenuation, *Sci. Rep.* 6 (2016) 36543.
- [125] M. Platten, C. Wild-Bode, W. Wick, J. Leitlein, D. Dichgans, M. Weller, N-[3,4-dimethoxycinnamoyl]-anthranilic acid (trinalast) inhibits transforming growth factor- $\beta$  release and reduces migration and invasiveness of human malignant glioma cells, *Int. J. Cancer* 93 (2001) 53–61.
- [126] J.B. Park, N. Schoene, Synthesis and characterization of N-Coumaroyltyramine as a potent phytochemical which arrests human transformed cells via inhibiting protein tyrosine kinases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 (2002) 1104–1110.
- [127] J.B. Park, N. Schoene, N-Caffeoyltyramine arrests growth of U937 and Jurkat cells by inhibiting protein tyrosine phosphorylation and inducing caspase-3, *Cancer Lett.* 202 (2003) 161–171.
- [128] E.-O. Kim, T.-K. Kwon, S.-W. Choi, Diferuloylputrescine, a predominant phenolic amide in corn bran, potently induces apoptosis in human leukemia U937 cells, *J. Med. Food* 17 (2014) 519–526.
- [129] M. Mitis, G.A. Alexiou, E. Vartholomatos, G. Markopoulos, D. Lazar, E. Hodaj, D. Nastos, P. Zagorianakou, V. Galani, A.P. Kyritsis, N-(p-coumaroyl) serotonin induces cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells, *J. BUON* 23 (2018) 129–133.
- [130] J. Hastings, J. Kenealy, Avenanthramide-C reduces the viability of MDA-MB-231 breast cancer cells through an apoptotic mechanism, *Cancer Cell Int.* 17 (2017) 93.
- [131] V. Subramaniam, O. Ace, G.J. Prud'homme, S. Jothy, Tranilast treatment decreases cell growth, migration and inhibits colony formation of human breast cancer cells, *Exp. Mol. Pathol.* 90 (2011) 116–122.
- [132] Y.-R. Lee, et al., Dihydroavenanthramide D inhibits human breast cancer cell invasion through suppression of MMP-9 expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405 (2011) 552–557.
- [133] M. Hiroi, M. Onda, E. Uchida, T. Aimoto, Anti-tumor effect of N-[3,4-dimethoxycinnamoyl]-anthranilic acid (tranilast) on experimental pancreatic Cancer, *J. Nippon Med. Sch.* 69 (2002) 224–234.
- [134] W. Guo, L. Nie, D. Wu, M.L. Wise, F.W. Collins, S.N. Meydani, M. Meydani, Avenanthramides inhibit proliferation of human colon cancer cell lines in vitro, *Nutr. Cancer* 62 (2010) 1007–1016.
- [135] E.S. Scarpa, M. Mari, E. Antonini, F. Palma, P. Ninfali, Natural and synthetic avenanthramides activate caspases 2, 8, 3 and downregulate hTERT, MDR1 and COX-2 genes in CaCo-2 and Hep3B cancer cells, *Food Funct.* 9 (2018) 2913–2921.
- [136] R. Fu, P. Yang, Z. Li, W. Liu, S. Amin, Z. Li, Avenanthramide A triggers potent ROS-mediated anti-tumor effects in colorectal cancer by directly targeting DDX3, *Cell Death Dis.* 10 (2019) 593.
- [137] R. Fu, P. Yang, S. Sajid, Z. Li, Avenanthramide A induces cellular senescence via miR-129-3p/Pirh2/p53 signaling pathway to suppress Colon Cancer growth, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 4808–4816.
- [138] F. Finetti, A. Moglia, I. Schiavo, S. Donnini, G.N. Berta, F. Di Scipio, A. Perrelli, C. Fornelli, L. Trabazini, S.F. Retta, Yeast-derived recombinant avenanthramides inhibit proliferation, migration and epithelial mesenchymal transition of Colon Cancer cells, *Nutrients* 10 (2018) 1159.
- [139] Z.-T. Bai, Z.-R. Wu, L.-L. Xi, X. Li, P. Chen, F.-Q. Wang, W.-B. Meng, W.-C. Zhou, X.-A. Wu, X.-J. Yao, M. Zhang, Inhibition of invasion by N-trans-feruloyltopamine via AKT, p38MAPK and EMT related signals in hepatocellular carcinoma cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 989–993.
- [140] F.R.S. Lima, et al., Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1826 (2012) 338–349.
- [141] W. Wu, Y. Tang, J. Yang, E. Idehen, S. Sang, Avenanthramide aglycones and glucosides in oat bran: chemical profile, levels in commercial oat products, and cytotoxicity to human Colon Cancer cells, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 8005–8014.
- [142] E. Turrini, F. Maffei, A. Milelli, C. Calcabrini, C. Fimognari, Overview of the anticancer profile of avenanthramides from oat, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4536.
- [143] G.M. Bol, M. Xie, V. Raman, DDX3, a potential target for cancer treatment, *Mol. Cancer* 14 (2015) 188.
- [144] V.J. Hearing, M. Jiménez, Mammalian tyrosinase—the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.* 19 (1987) 1141–1147.
- [145] T. Pillaiyar, M. Manickam, V. Namasivayam, Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32 (2017) 403–425.
- [146] J.S. Roh, J.Y. Han, J.H. Kim, J.K. Hwang, Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis, *Biol. Pharm. Bull.* 27 (2004) 1976–1978.
- [147] Y. Yamazaki, Y. Kawano, A. Yamanaka, S. Maruyama, N-[(Dihydroxyphenyl)acyl] serotonin as potent inhibitors of tyrosinase from mouse and human melanoma cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 4178–4182.
- [148] S. Okombi, D. Rival, S. Bonnet, A.-M. Mariotte, E. Perrier, A. Boumendjel, Analogues of N-hydroxycinnamoylphenylalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2252–2255.
- [149] S. Okombi, D. Rival, A. Boumendjel, A.-M. Mariotte, E. Perrier, Para-coumaric Acid or Para-Hydroxycinnamic Acid Derivatives and Their Use in Cosmetic or Dermatological Compositions, 2013.
- [150] S. Okombi, D. Rival, A. Boumendjel, A.-M. Mariotte, E. Perrier, Para-Coumaric Acid or Para-Hydroxycinnamic Acid Derivatives and Their Use in Cosmetic or Dermatological Compositions, 2015.
- [151] M. Efdi, K. Ohguchi, Y. Akao, Y. Nozawa, M. Koketsu, H. Ishihara, N-trans-feruloyltyramine as a melanin biosynthesis inhibitor, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 1972–1974.
- [152] Y. Kim, S. Lee, J.H. Ryu, K.D. Yoon, S.S. Shin, Effect of Aurea Helianthus stem extract on anti-melanogenesis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82 (2018) 1871–1879.
- [153] S.B. Kim, Q. Liu, J.H. Ahn, Y.H. Jo, A. Turk, I.P. Hong, S.M. Han, B.Y. Hwang, M. K. Lee, Polyamine derivatives from the bee pollen of *Quercus mongolica* with tyrosinase inhibitory activity, *Bioorganic Chem.* 81 (2018) 127–133.
- [154] M.K. Khan, Zill-E-Huma, O. Dangles, A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols, *J. Food Anal.* 33 (2014) 85–104.
- [155] K. Pei, J. Ou, J. Huang, S. Ou, p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities, *J. Sci. Food Agric.* 96 (2016) 2952–2962.
- [156] Z. Zhao, M.H. Moghadasian, Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies, *Phytochem. Rev.* 9 (2010) 133–145.
- [157] C.-Y.O. Chen, P.E. Milbury, F.W. Collins, J.B. Blumberg, Avenanthramides are bioavailable and have antioxidant activity in humans after acute consumption of an enriched mixture from oats, *J. Nutr.* 137 (2007) 1375–1382.
- [158] R.T. Koenig, J.R. Dickman, M.L. Wise, L.L. Ji, Avenanthramides are bioavailable and accumulate in hepatic, cardiac, and skeletal muscle tissue following oral gavage in rats, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 6438–6443.
- [159] S. Gonzalez-Manzano, A. Gonzalez-Paramas, C. Santos-Buelga, M. Duenas, Preparation and characterization of catechin sulfates, Glucuronides, and methylethers with metabolic interest, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 1231–1238.
- [160] P. Wang, H. Chen, Y. Zhu, J. McBride, J. Fu, S. Sang, Oat Avenanthramide-C (2c) is biotransformed by mice and the human microbiota into bioactive metabolites, *J. Nutr.* 145 (2015) 239–245.
- [161] T. Garnelis, C. Athanassopoulos, D. Papaioannou, I. Eggleston, A. Fairlamb, Very short and efficient syntheses of the spermine alkaloid kukoamine a and analogs using isolable succinimidyl cinnamates, *Chem. Lett.* (2005) 34.
- [162] A. Schmidt, R. Grimm, J. Schmidt, D. Scheel, D. Strack, S. Rosahl, Cloning and expression of a potato cDNA encoding Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine N-(Hydroxycinnamoyl)transferase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 4273–4280.
- [163] M.J. Farmer, P. Czernic, A. Michael, J. Negrel, Identification and characterization of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco, *Eur. J. Biochem.* 263 (1999) 686–694.
- [164] E. von Roepenack-Lahaye, M.-A. Newman, S. Schornack, K.E. Hammond-Kosack, T. Lahaye, J.D.G. Jones, M.J. Daniels, J.M. Dow, P-coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43373–43383.
- [165] S. Kang, K. Kang, G.C. Chung, D. Choi, A. Ishihara, D.-S. Lee, K. Back, Functional analysis of the amine substrate specificity domain of pepper tyramine and serotonin N-Hydroxycinnamoyltransferases, *Plant Physiol.* 140 (2006) 704–715.
- [166] A. Muroi, A. Ishihara, C. Tanaka, A. Ishizuka, J. Takabayashi, H. Miyoshi, T. Nishioka, Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*, *Planta* 230 (2009) 517.
- [167] C. Elejalde-Palmett, D. Berthonville, T. Dugé, G. Glevarec, O. Pichon, N. Papon, V. Courdavault, B. St-Pierre, N. Giglioli-Guivarc'h, A. Lanoue, S. Besseau, Characterization of a spermidine hydroxycinnamoyltransferase in *Malus domestica* highlights the evolutionary conservation of trihydroxycinnamoyl spermidines in pollen coat of core Eudicotyledons, *J. Exp. Bot.* 66 (2015) 7271–7285.
- [168] K. Tanabe, Y. Hojo, T. Shinya, I. Galis, Molecular evidence for biochemical diversification of phenolamide biosynthesis in rice plants, *J. Integr. Plant Biol.* 58 (2016) 903–913.
- [169] H. Peng, T. Yang, B.D. Whitaker, F. Trout, L. Shangguan, W. Dong, W.M. Jurick, Characterization of spermidine hydroxycinnamoyl transferases from eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relative *Solanum richardii* Dunal, *Hortic. Res.* 3 (2016) 16062.
- [170] N. Ube, D. Harada, Y. Katsuyama, K. Osaki-Oka, T. Tonooka, K. Ueno, S. Taketa, A. Ishihara, Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat, *Phytochemistry* (2019) 167. UNSP 112098.
- [171] S.-M. Jang, A. Ishihara, K. Back, Production of Coumaroylserotonin and feruloylserotonin in transgenic rice expressing pepper hydroxycinnamoyl-coenzyme a:serotonin N-(Hydroxycinnamoyl)transferase, *Plant Physiol.* 135 (2004) 346–356.
- [172] J.M. Hagel, P.J. Facciini, Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves, *Planta* 221 (2005) 904–914.

- [173] K. Kang, K. Lee, S.-O. Sohn, S. Park, S. Lee, S.Y. Kim, Y.S. Kim, K. Back, Ectopic expression of serotonin N-hydroxycinnamoyltransferase and differential production of phenylpropanoid amides in transgenic tomato tissues, *Sci. Hortic.* 120 (2009) 504–510.
- [174] L. Campos, P. Lisón, M.P. López-Gresa, I. Rodrigo, L. Zácarés, V. Conejero, J. M. Bellés, Transgenic tomato plants overexpressing tyramine N-Hydroxycinnamoyltransferase exhibit elevated hydroxycinnamic acid amide levels and enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 27 (2014) 1159–1169.
- [175] K. Kang, M. Park, S. Park, Y.S. Kim, S. Lee, S.-G. Lee, K. Back, Production of plant-specific tyramine derivatives by dual expression of tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase and 4-coumarate:coenzyme A ligase in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 1469–1475.
- [176] A. Moglia, L. Goitre, S. Gianoglio, E. Baldini, E. Trapani, A. Genre, A. Scattina, G. Dondo, L. Trabalzini, J. Beekwilder, S.F. Retta, Evaluation of the bioactive properties of avenanthramide analogs produced in recombinant yeast, *BioFactors* 41 (2015) 15–27.
- [177] P. Bouchez, V.T. Benites, E.E.K. Baidoo, J.C. Mortimer, M.L. Sullivan, H. V. Scheller, A. Eudes, Production of clovamide and its analogues in *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactococcus lactis*, *Lett. Appl. Microbiol.* 69 (2019) 181–189.
- [178] G.Y. Sim, S.-M. Yang, B.G. Kim, J.-H. Ahn, Bacterial synthesis of N-hydroxycinnamoyl phenethylamines and tyramines, *Microb. Cell Factories* 14 (2015) 162.
- [179] M.K. Song, S.J. Lee, Y.Y. Kang, Y. Lee, H. Mok, J.-H. Ahn, Biological synthesis and anti-inflammatory activity of arylalkylamine, *Appl. Biol. Chem.* 60 (2017) 597–602.
- [180] K. Kang, K. Back, Production of phenylpropanoid amides in recombinant *Escherichia coli*, *Metab. Eng.* 11 (2009) 64–68.
- [181] A. Eudes, et al., Exploiting members of the BAHD acyltransferase family to synthesize multiple hydroxycinnamate and benzoate conjugates in yeast, *Microb. Cell Factories* 15 (2016) 198.
- [182] Y. Voynikov, D. Zheleva-Dimitrova, R. Gevrenova, V. Lozanov, M.M. Zaharieva, I. Tsvetkova, H. Najdenski, S. Yagi, N.F. Almoulah, G. Momekov, Hydroxycinnamic acid amide profile of *Solanum schimperianum* Hochst by UPLC-HRMS, *Int. J. Mass Spectrom.* 408 (2016) 42–50.
- [183] J. Kyselka, R. Bleha, M. Dragoun, K. Bialasová, Š. Horáčková, M. Schätz, M. Sluková, V. Filip, A. Syntysa, Antifungal Polyamides of Hydroxycinnamic Acids from Sunflower Bee Pollen, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 11018–11026.
- [184] A. Moglia, S. CominoLanteri, R. de Vos, P. de Waard, T. van Beek, L. Goitre, S. F. Retta, J. Beekwilder, Production of novel antioxidative phenolic amides through heterologous expression of the plant's chlorogenic acid biosynthesis genes in yeast, *Metab. Eng.* 12 (2010) 223–232.

## Résumé

Les phénolamides constituent une famille des métabolites spécialisés qui s'accumulent chez une grande diversité d'espèces végétales. Ils ont des fonctions dans l'initiation florale, interviennent dans les réponses des plantes à des stress, et ils entrent dans la composition des parois de grains de pollen. De plus, leur bioactivité thérapeutique a été décrite en tant que molécule anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-microbienne ou anti-cancéreuse. Des travaux récents du laboratoire ont montré que la tomate produit des phénolamides, notamment lorsqu'elle subit l'herbivorie du ravageur *Tuta absoluta*. Leur rôle dans la défense des plantes reste à instruire. Dans ce cadre, un premier objectif de ma thèse a été de moduler la composition en phénolamides chez la tomate afin d'évaluer les conséquences de cette modulation sur le fonctionnement de la plante et sa capacité à se défendre. Un second objectif a été de déterminer le potentiel thérapeutique de ces phénolamides identifiés chez la tomate, par des tests de criblage d'activité. Un préalable à la génération de plantes modifiées génétiquement pour leur capacité de synthèse de phénolamides, a été d'identifier de nouveaux gènes contrôlant l'accumulation de phénolamides dans la plante. Nous avons exploité notre banque ARN Seq de tomate et des travaux chez d'autres solanacées. Nous avons identifié dix gènes candidats, dont deux codant pour des facteurs de transcription et huit pour des acyltransférases. La caractérisation fonctionnelle de ces candidats n'a, pour le moment, pas mené à l'identification de nouvelle fonction enzymatique associée à la voie des phénolamides. Ce travail devra être poursuivi en élargissant le spectre de substrat testés sur les candidats identifiés et en ciblant d'autres gènes candidats. Pour générer les plantes modifiées génétiquement, j'ai réalisé un travail de développement méthodologique volumineux, ayant nécessité de maîtriser au laboratoire des protocoles de transformation et de régénération sur l'espèce tomate, et d'acquérir et maîtriser la technique d'édition de gène (CRISPR/cas9). La technique mise au point conduit à une forte efficacité de transformation, que ce soit en surexpression ou en édition de gène. Nous avons générés ainsi 94 lignées de tomates dont l'expression des gènes de putrescine hydroxycinnamoyl transférase (PHT) responsable de l'accumulation de cafféoylputrescine, a été modifiée à la hausse ou à la baisse, tout comme l'expression du facteur de transcription solyc06g083900.2 susceptible d'être impliquée dans l'accumulation d'un ensemble plus large de phénolamides. Les plantes obtenues sont maintenant disponibles pour un travail de caractérisation de leur contenu métabolique et des conséquences physiologiques des modifications générées. Nous avons évalué le potentiel thérapeutique de quelques phénolamides de tomate induits par l'herbivorie de *T. absoluta*. L'obtention de molécules pures a demandé le concours de chimistes. Parmi les molécules évaluées, la cafféoylputrescine et la kukoamine présentent des activités antibactériennes modérées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*. Les tests ont révélé la propriété anti-inflammatoire de la cafféoylputrescine sur des cellules de macrophage. Ces travaux confirment le potentiel thérapeutique des phénolamides. Ils seront poursuivis en vue de l'évaluation de leurs propriétés anti-cancéreuses.

**Mots clés :** Phénolamides, tomate, *Tuta absoluta*, N-acyltransférases, facteur de transcription, surexpression, édition génétique, anti-inflammatoire, antibactériens.

## Abstract

Phenolamides are a family of specialized metabolites that accumulate in a wide variety of plant species. They have functions in flower initiation, are involved in plant responses to stress, and they are part of the composition of the walls of pollen grains. In addition, their therapeutic bioactivity has been described as an antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial or anti-cancer molecule. Recent laboratory work has shown that the tomato produces phenolamides, especially when it is attacked by the pest *Tuta absoluta*. Their role in the defense of plants remains unclear. In this context, a first objective of my thesis was to modulate the composition of phenolamides in tomatoes in order to assess the consequences of this modulation on the functioning of the plant and its ability to defend itself. A second objective was to determine the therapeutic potential of these phenolamides identified in tomatoes, by screening tests for activity. A prerequisite for the generation of plants genetically modified for their capacity to synthesize phenolamides, has been to identify new genes controlling the accumulation of phenolamides in the plant. We have exploited our RNA Seq tomato bank and work in other Solanaceae. We have identified ten candidate genes, two of which code for transcription factors and eight for acyltransferases. The functional characterization of these candidates has so far not led to the identification of any new enzymatic function associated with the phenolamide pathway. This work should be continued by broadening the spectrum of substrate tested on the identified candidates and by targeting other candidate genes. To generate the genetically modified plants, I carried out a methodological work, in the laboratory, to develop transformation and regeneration protocols on the tomato species, and the gene editing technique, (CRISPR / cas9). The techniques developed lead to a high efficiency of transformation, whether in overexpression or in gene editing. We thus generated 94 lines of tomatoes in which the expression of the putrescine hydroxycinnamoyl transferase (PHT) genes responsible for the accumulation of caffeoyleputrescine was modified upward or downward, as was the expression of the transcription factor solyc06g083900 .2 likely to be involved in the accumulation of a wider set of phenolamides. The plants obtained are now available for characterization work on their metabolic content and the physiological consequences of the modifications generated. We evaluated the therapeutic potential of some tomato phenolamides induced by the herbivory of *T. absoluta*. Obtaining pure molecules required the help of chemists. Among the molecules evaluated, caffeoyleputrescine and kukoamine A exhibit moderate antibacterial activities against *Staphylococcus aureus*. The tests revealed the anti-inflammatory property of caffeoyleputrescine on macrophage cells. This work confirms the therapeutic potential of phenolamides. They will be prosecuted for the evaluation of their anti-cancer properties.

**Key words:** Phenolamides, tomato, *Tuta absoluta*, N-acyltransferase, transcription factors, overexpression, genetic editing, anti-inflammatory, antibacterial.