



## 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>

MASTER 2 FAGE  
Biologie et Ecologie pour la Forêt,  
l'Agronomie et l'Environnement  
Spécialité Biologie des interactions  
plantes/environnement

Mise au point d'une méthode d'incorporation  
de phénylalanine marquée au carbone 13  
dans les feuilles et les racines de tomate  
en vue d'études de fluxomique  
sur la voie des composés phénoliques.

Nicolas GRIPON

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 08/07/2011

Maître de stage : Romain LARBAT, CR INRA

Structure d'accueil :  
UMR 1121 Nancy Université (INPL) – INRA  
Laboratoire Agronomie et Environnement  
2, avenue de la forêt de Haye  
54505 Vandœuvre lès Nancy



## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier chaleureusement mon maître de stage Romain Larbat, pour son aide, ses conseils et sa grande disponibilité. Il m'a fait découvrir avec patience le monde des polyphénols. Il m'a initié aux analyses en LC-MS et à la Rt-PCR ; domaines où il a eu beaucoup à m'apprendre et qui m'ont fort intéressé. J'ai pu découvrir le monde de la recherche et la riche vie du laboratoire.

Je remercie Frédéric Bourgaud et Sylvain Plantureux de m'avoir accueilli au sein du laboratoire Agronomie et Environnement. Mes remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe que j'ai côtoyé au quotidien. Les journées ont été agréables grâce à leur bonne humeur et à leur gentillesse.

Merci en particulier à Christophe Robin pour ses nombreux conseils, spécialement lors de la définition de mon sujet de stage. Merci à lui pour son assistance lors des manipulations de physiologie sur les plants de tomate.

Merci à Cédric Paris qui a réalisé nos analyses LC-MS, pour les week-ends dédiés à nos échantillons, pour sa disponibilité et ses conseils.

Merci à Mathilde Royer pour son aide et ses conseils sur la méthode de culture en hydroponie des tomates et sur les différentes étapes de traitement des échantillons.

Un merci spécial à Simon Taugourdeau pour son assistance dans le traitement de mes données, en particulier le traitement statistique. Merci à lui pour sa disponibilité et pour son excellente formation à l'utilisation du logiciel R qu'il a généreusement prodigué à tous les « nouveaux ».

Enfin merci à ma petite famille pour son aide et son soutien constant.

# Sommaire

Introduction .....	1
Matériel et méthodes .....	5
1-Culture des plants de tomate .....	5
2-Préparation des solutions d'incubation .....	6
3-Protocoles des modes d'introduction de la PHE*.....	6
a-Incubation des racines (plante entière ou fragments racinaires) .....	6
b-Incubation des feuilles (trempage, spray ou infiltration) .....	6
c-Récolte des échantillons.....	7
4-Extraction des composés phénoliques à partir des échantillons végétaux .....	7
5-Analyses en HPLC-MS .....	7
6-Suivi de l'umbelliférone dans la plante.....	8
7-Mesure de paramètres physiologiques .....	8
8-Expression des gènes par Rt-PCR .....	8
9-Statistiques.....	8
Résultats .....	10
1-Enrichissement de PHE .....	10
2-Homogénéité spatiale du marquage.....	11
3-Enrichissement des polyphénols.....	12
4-Suivi des perturbations engendrées par l'incorporation de PHE*.....	14
a-Suivi des paramètres physiologiques .....	14
b-Evolution des pools de métabolites naturels .....	16
c-Suivi de l'expression de gènes .....	18
Discussion.....	19
1-Choix de la méthode d'incorporation de PHE* pour les racines .....	19
2-Choix de la méthode d'incorporation de PHE* pour les feuilles .....	20
Conclusion .....	22
Bibliographie.....	23
Résumé .....	24

## Abréviations utilisées

$^2\text{H}$  : isotope 2 de l'hydrogène (stable)

$^{13}\text{C}$  : isotope 13 du carbone (stable)

$^{15}\text{N}$  : isotope 15 de l'azote (stable)

ACG : acide chlorogénique

ACG\* : acide chlorogénique marqué au  $^{13}\text{C}$

AFM : analyse de flux métabolique

DMSO : diméthylsulfoxyde

F3'5'H : Flavonoïde 3'5' Hydroxylase

F3'H : Flavonoïde 3' Hydroxylase

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

HR : humidité relative

LC-MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse

ms : matière sèche

MS : spectromètre de masse

PAL : phénylalanine-ammonia-lyase

PHE : phénylalanine

PHE\* : phénylalanine marquée au  $^{13}\text{C}$  et à  $^{15}\text{N}$

Polyphénols\* : polyphénols marqués au  $^{13}\text{C}$

SAI : sève artificielle d'incubation (xylémienne)

SNI : solution nutritive d'incubation

RMN : résonnance magnétique nucléaire

Rt-PCR : réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

UA : unité arbitraire

## Introduction

Le métabolisme secondaire des végétaux rassemble les composés présents à faible concentration qui ne participent pas directement à la croissance et au développement de la plante. On y trouve une grande variété de molécules et de familles moléculaires dont celle des composés phénoliques (ou polyphénols) qui est une famille ubiquiste dans le règne végétal. Ceux-ci ont des fonctions pour la plante très diversifiées. Une fonction importante est la défense contre les microorganismes pathogènes avec différents effets de toxicité, principalement contre les champignons (Benhamou, 2009). Ces molécules peuvent également agir contre des ravageurs (nématodes, mollusques, insectes,...) avec des effets toxiques ou des effets anti-nutritionnels (Bennett *et al.*, 1994). Les mécanismes de défense peuvent également viser les plantes environnantes. Ces effets allélopathiques se caractérisent par l'inhibition de la germination ou de la croissance des plantes compétitrices (Macheix *et al.*, 2005).

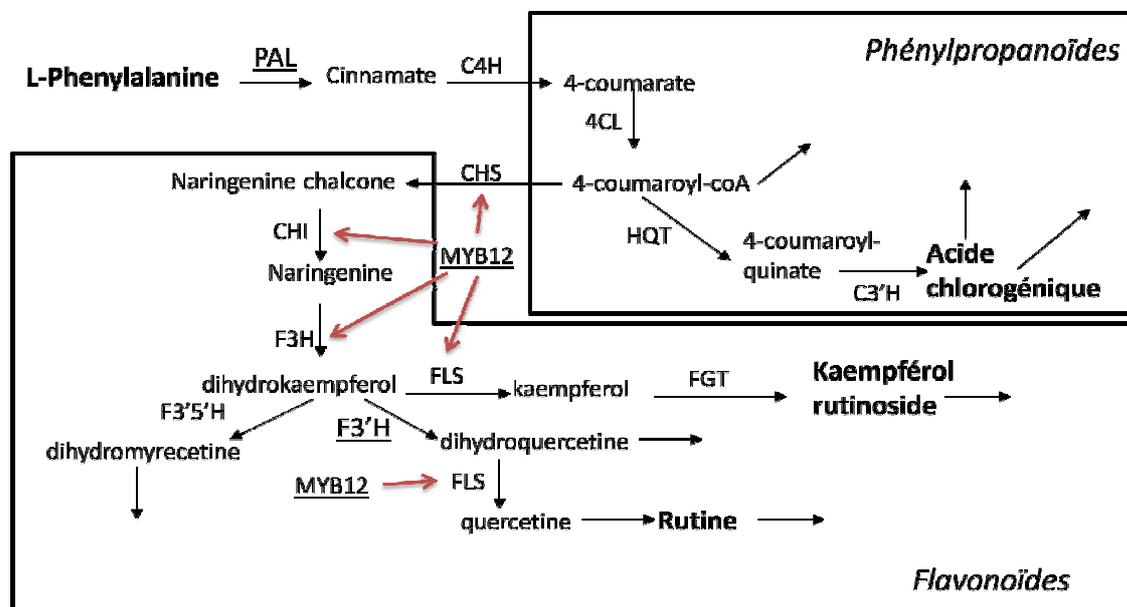
Les flavonoïdes, en colorant les fleurs ou en modifiant leur spectre dans l'UV permettent l'attraction des pollinisateurs (Macheix *et al.*, 2005). Les flavonoïdes sont impliqués dans l'établissement des relations symbiotiques entre les Fabacées et les bactéries du genre *Rhizobium* (et genres apparentés). Ils auraient une action stimulatrice sur l'établissement des relations mycorhiziennes (Treutter, 2006). En absorbant le rayonnement UV, de nombreux composés phénoliques protègent les tissus végétaux. Ces molécules ont également des propriétés antioxydantes (Treutter, 2006). La lignine, en permettant des ports élevés, donne un avantage compétitif aux végétaux ligneux pour l'accès à la lumière (Macheix *et al.*, 2005). Les composés phénoliques sont ainsi impliqués dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. De par leur rôle dans la défense des plantes, la maîtrise de leur accumulation par des modifications génétiques ou par des contrôles environnementaux devrait permettre des développements appliqués dans le cadre de la protection des cultures et des récoltes.

Les voies de biosynthèse des polyphénols sont sensibles à l'environnement de la plante. Les facteurs qui augmentent les teneurs sont abiotiques ou biotiques. Il s'agit en particulier de la lumière de forte intensité ou riche en UV et de l'action des températures faibles ou élevées (Dixon & Paiva, 1995). D'un point de vue nutritionnel, les limitations en éléments minéraux (phosphore, bore, fer) induisent également des augmentations de teneurs (Camacho-Cristóbal *et al.*, 2002 ; Dixon & Paiva, 1995 ; Stewart *et al.*, 2001). Les limitations en azote ont un effet stimulateur bien documenté (Benard *et al.*, 2009 ; Fritz *et al.*, 2006 ; Le Bot *et al.*, 2009 ; Leser & Treutter, 2005 ; Løvdal *et al.*, 2010 ; Stewart *et al.*, 2001). Les pathogènes et les ravageurs ont aussi un effet inducteur, via des stimuli de nature mécanique ou chimique (éliciteurs) (Benhamou, 2009 ; Dixon & Paiva, 1995 ; Treutter, 2006).

La voie de biosynthèse des composés phénoliques dérive d'un précurseur : la phénylalanine (PHE). Cet acide aminé aromatique entre dans la voie de biosynthèse par l'enzyme phénylalanine-ammonia-lyase (PAL). La phénylalanine donne son squelette carboné de type C6-C3 aux phénylpropanoïdes et dérivés (coumarines, dérivés hydroxycinnamiques, monomères de lignine et autres). L'enzyme chalcone synthase (CHS) constitue un embranchement dans la voie de biosynthèse et est à l'origine du squelette carboné des flavonoïdes de type C6-C3-C6 (flavones, flavonols, anthocyanes, tannins et autres) (Vogt, 2010) (**figure 1**).

J'ai effectué mon stage, sous la responsabilité de Romain Larbat, chargé de recherche INRA, au sein de l'équipe « métabolisme secondaire » du laboratoire « Agronomie et Environnement » (LAE) qui est une UMR INRA-Institut National Polytechnique Lorrain (INPL). Cette équipe travaille notamment sur l'influence de paramètres environnementaux sur l'accumulation des polyphénols chez la tomate. Ces recherches s'inscrivent dans le contexte actuel de modifications des pratiques agricoles qui comprend notamment une diminution de

l'utilisation des produits phytosanitaires. Dans ce contexte, les objectifs de l'équipe sont (i) de comprendre les conjonctions de facteurs environnementaux pouvant conduire à une synthèse accrue de métabolites secondaires sans pour autant réduire le potentiel de production et (ii) d'évaluer le bénéfice d'une synthèse accrue de métabolites secondaires sur la résistance de la plante aux bio-agresseurs. Dans cette optique, l'équipe a pour objectif la modélisation des flux métaboliques de la voie de biosynthèse des composés phénoliques de la tomate.



**Figure 1 : Représentation partielle et simplifiée de la voie de biosynthèse des composés phénoliques. En gras : les métabolites étudiés. Souligné : les gènes étudiés.** MYB12 est un facteur de transcription (Olsen *et al.*, 2009). *En italique : les deux branches principales.*

L'analyse des flux métaboliques (AFM) nécessite de bien connaître au préalable le réseau métabolique qui va être étudié (Libourel & Shachar-Hill, 2008). Elle est basée sur l'utilisation d'un précurseur marqué par des isotopes radioactifs ou stables. Il y a deux types d'AFM : l'étude cinétique où une dose du précurseur marqué est suivie au travers de la voie métabolique et l'étude à l'état stationnaire où le précurseur est fourni en continu de façon à ce que le marquage de chaque métabolite soit stable dans le temps (Ratcliffé & Shachar-Hill, 2006). La méthode à l'état stationnaire est préférable pour caractériser les flux métaboliques mais cet état est difficile à atteindre chez les plantes ; c'est donc l'étude cinétique qui est en général utilisée (Heinzle *et al.*, 2007). L'enrichissement de chaque métabolite (*i.e.* teneur en métabolite marqué/teneur totale en métabolite) est mesuré par RMN ou LC-MS (Libourel & Shachar-Hill, 2008). Pour chaque métabolite, le flux de synthèse et le flux catabolique est calculé (Matsuda *et al.*, 2005). A partir de données bibliographiques, un modèle mathématique est construit puis testé expérimentalement. L'AFM est une approche complexe du point de vue méthodologique mais elle présente des avantages sur d'autres types d'approches (expression de gène, activité enzymatique ou teneur en métabolite). En effet, elle donne une image dynamique du métabolisme en précisant les flux d'entrée et de sortie pour chaque pool. En outre, elle présente l'intérêt d'obtenir des résultats *in planta* (pas de mesures *in vitro*).

Lors d'études antérieures de type AFM sur la voie des composés phénoliques, c'est le précurseur PHE qui était marqué par un isotope stable ( $^2\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ ) (Boatright *et al.*, 2004 ; Heinzle *et al.*, 2007 ; Matsuda *et al.*, 2005). Ces études ont été réalisées sur des organes ou tissus isolés (fragments de tubercules de pomme de terre ou pétale excisé).

L'objectif étant de réaliser une AFM des composés phénoliques chez la tomate sous l'effet de la nutrition azotée, l'équipe a besoin d'une méthode d'incorporation d'un précurseur marqué dans la tomate. La feuille est ciblée par ce marquage car elle est exposée aux attaques de bio-agresseurs. La racine est également choisie car elle présente une réponse différente (par son amplitude) à la carence azotée (thèse Benard, 2009). Le précurseur choisi est PHE, situé au point de départ de la voie métabolique (**figure 1**). PHE est marqué par un isotope stable ( $^{13}\text{C}$ ) pour des raisons de simplicité et de sécurité d'utilisation.

La technique d'introduction doit être aussi peu perturbante que possible pour éviter tout phénomène de stress pouvant modifier les résultats. Les contraintes sont d'une part d'obtenir un marquage suffisant en quantité et homogène dans le temps et dans l'espace. D'autre part, la quantité de PHE marquée introduite ne doit pas trop modifier l'ordre de grandeur du pool total de PHE. D'une façon générale, la physiologie et le métabolisme doivent être perturbés au minimum. L'objet de mon stage a donc été cette mise au point méthodologique.

Nous avons testé un total de 5 modalités de marquage ; dont 2 pour le marquage des racines :

- **Incubation de plantes entières par ajout dans le milieu nutritif.**  
Les plantes absorbent facilement les acides aminés par voie racinaire, ce mode de nutrition azotée est même important dans certains écosystèmes ayant des sols à minéralisation réduite (Hirner *et al.*, 2006 ; Näsholm *et al.*, 2009 ; Persson *et al.*, 2002). Dans notre cadre expérimental, l'introduction de PHE dans les racines est donc réalisée avec des plantes entières par ajout dans le milieu nutritif en bénéficiant de ce processus naturel.
- **Incubation de fragments racinaires excisés.**  
Des résultats intéressants sur organe excisé ayant été publiés (Boatright *et al.*, 2004 ; Matsuda *et al.*, 2005), une modalité avec racines excisées est testée.

Nous avons testé 3 modalités pour le marquage des feuilles :

- **Incubation de feuilles excisées dans une sève artificielle d'incubation.**  
Les acides aminés prélevés par les racines pouvant être métabolisés à ce niveau (Näsholm *et al.*, 2009), l'introduction dans les feuilles se fera donc idéalement directement au niveau foliaire. Les feuilles sont naturellement alimentées en acides aminés par la sève xylémienne (Fisher *et al.*, 2002 ; Hirner *et al.*, 2006). Par conséquent, nous avons souhaité tester cette modalité d'introduction directe dans la feuille par aspiration d'une sève artificielle grâce au flux transpiratoire.
- **Le spray sur feuilles de plantes entières.**  
Cette technique et la suivante permettent également une introduction directe au niveau de la feuille. Le spray d'acides aminés sur des feuilles de radis a déjà été utilisé pour l'étude du métabolisme azoté (Liu *et al.*, 2008).
- **L'infiltration de feuilles de plantes entières.**  
L'infiltration d'organe est utilisée pour réaliser des transformations génétiques transitoires, notamment sur tomate (Romero *et al.*, 2011).

Toutes ces modalités sont testées avec un large éventail de concentration de PHE\*.

L'efficacité de ces méthodes a été évaluée par différentes mesures :

- ❖ **Des mesures de l'enrichissement des pools de PHE.**  
Les résultats de l'enrichissement du pool de PHE nous ont permis de faire une première sélection parmi les modalités de marquage ; selon des critères d'intensité, de vitesse et de stabilité dans le temps du marquage.
- ❖ **Un suivi par fluorescence de l'umbelliférone dans la plante.**  
Le suivi photographique de la distribution dans les organes d'une molécule fluorescente proche de PHE (umbelliférone) nous a permis d'évaluer l'homogénéité spatiale du marquage dans l'organe ciblé.

❖ **Des mesures de l'enrichissement des pools de polyphénols.**

Trois composés phénoliques, distribués à différents niveaux de la voie métabolique (**figure 1**) sont ciblés : l'acide chlorogénique (ACG) (phénylpropanoïde), la rutine et le kaempférol-rutinoside (flavonoïdes). L'intensité du marquage de la voie des polyphénols permet d'affiner la sélection opérée précédemment ; en particulier vis-à-vis des concentrations de PHE\* utilisées.

❖ **Le suivi de paramètres physiologiques de la plante soumise à l'incubation.**

Nous avons mesuré les échanges gazeux au niveau des feuilles. Deux paramètres intégratifs sont présentés dans les résultats : l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> et la transpiration. Ceci nous permet d'évaluer le niveau de perturbation de la physiologie à l'échelle de la plante et de l'organe suite au marquage.

❖ **Le suivi des pools naturels de polyphénols et de l'expression de gènes impliqués dans la voie métabolique.**

Nous avons mesuré l'évolution des pools naturels de polyphénols (ACG, rutine et kaempférol-rutinoside) au cours de la période de marquage. Ceci nous indique d'éventuelles perturbations des équilibres de la voie métabolique. De plus, un suivi de l'expression de certains gènes impliqués dans la voie métabolique nous a permis de détecter une éventuelle modification au niveau transcriptionnel pour les feuilles et pour les racines. Ce sont les gènes codant pour deux enzymes de la voie métabolique : la PAL et la Flavonoïde 3' Hydroxylase (F3'H). Le gène d'un facteur de transcription intervenant notamment dans la branche des flavonoïdes est également suivi : MYB12 (Olsen *et al.*, 2009 ; Løvdaal *et al.*, 2010) (**figure 1**).

La première partie de ce mémoire expose les matériels, techniques et protocoles utilisés et qui relèvent des domaines de la biochimie, de la physiologie végétale et de la biologie moléculaire. La deuxième partie présente les principaux résultats obtenus suite aux différentes études. Pour terminer, la troisième partie permet de discuter les résultats et d'émettre un avis sur l'intérêt des modes d'incorporation de PHE\* investigués.

# Matériels et méthodes

## 1. Culture des plants de tomate

Un grand nombre de jeunes plants de tomate (*Lycopersicon esculentum*) ont été utilisés au cours du stage. Le cultivar utilisé (variété Better Bush, graines de Reimer Seeds, USA) est une variété naine à croissance indéterminée. Elle a été choisie car elle a une croissance modérée et une réponse marquée à la limitation en azote. Trois cultures sont réalisées en hydroponie dans un phytotron (25°C le jour et 20°C la nuit, 75% HR le jour et 70% HR la nuit, photopériode de 14h), par série de 100 plants environ.

Le liquide nutritif est conçu pour ne pas être limitant. Des sels sont mis en solution dans l'eau du robinet selon le **tableau 1**. Une solution d'oligo-éléments (préparée selon le **tableau 2**) est ajoutée à raison de 15mL pour 50L. Le pH est ajusté entre 4,9 et 5,1 avec une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N.

Sels	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	EDTA-Fe·1H <sub>2</sub> O
concentration en mM.L <sup>-1</sup>	1	1	3,5	1,5	0,043

**Tableau 1 : Concentration des sels du milieu nutritif**

Sels	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	EDTA-Fe·2H <sub>2</sub> O
concentration en mM.L <sup>-1</sup>	0,938	38,832	10,809	1,574	68,757	35,812

**Tableau 2 : Concentration des sels de la solution d'oligo-éléments**

Chaque graine est déposée dans un court tube de PVC dont le fond est constitué par un fin grillage en matière plastique souple. Les tubes sont engagés dans les trous d'une grande plaque en PVC opaque recouvrant un seul bac de 38 L rempli de solution nutritive. Les tubes sont réglés de façon à ce que les grillages plastiques affleurent la solution nutritive. Un couvercle opaque recouvre l'ensemble pendant la durée de la germination (3 jours). Au bout de 7 jours après semis, les tubes (contenant chacun un plant au stade cotylédons développés) sont transférés dans un dispositif similaire mais plus spacieux qui permet le développement des plants. Des bacs plastiques de 2 L sont remplis avec une solution nutritive neuve. Deux tubes sont engagés dans deux trous d'un couvercle recouvrant le bac. Les tubes sont enfoncés jusqu'à ce que le grillage plastique affleure la solution nutritive. Le niveau de la solution est vérifié et ajusté tous les jours. Un fin tube placé au fond de chaque bac assure un bullage d'air. Le dispositif reste en place jusqu'à la récolte au stade 4 feuilles développées ; au bout de 4 semaines (**figure 2**).



**Figure 2 : Dispositif de culture (plants de 1 et 4 semaines)**

## 2. Préparation des solutions d'incubation

La PHE\* est marquée au  $^{13}\text{C}$  sur ses 9 carbones et au  $^{15}\text{N}$  sur son azote. Elle est conditionnée en poudre (Cambridge Isotope Laboratories).

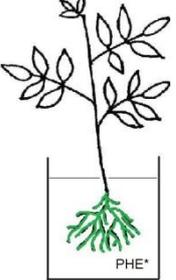
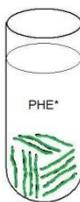
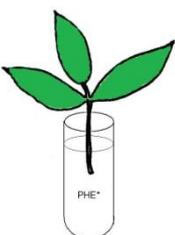
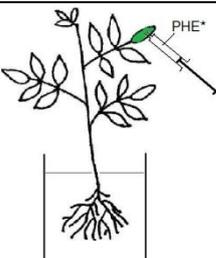
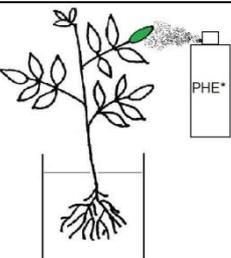
La solution nutritive d'incubation (SNI) utilisée pour le marquage par voie racinaire (plante entière ou fragments racinaires) correspond à la solution nutritive de croissance additionnée de PHE\* aux concentrations de  $10\mu\text{M}$ ,  $30\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  ou  $1\text{mM}$ .

La solution d'incubation utilisée pour les feuilles est une sève artificielle (préparation d'après Wilkinson *et al.*, 1998) simulant une sève xylémienne ; elle est nommée sève artificielle d'incubation (SAI). Elle est préparée par dissolution dans l'eau distillée des sels suivants (concentration en  $\text{mM.L}^{-1}$ ) :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1) ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1) ;  $\text{CaCl}_2$  (1) ;  $\text{MgSO}_4$  (0,1) ;  $\text{KNO}_3$  (3) ;  $\text{MnSO}_4$  (0,1). Le pH final est ajusté entre 5,9 et 6,1 à l'aide d'une solution de HCl ou KOH ( $1\text{ mol.L}^{-1}$ ).

La solution de spray est réalisée d'après Liu *et al.* (2008): la PHE\* est dissoute dans de l'eau distillée, le pH est ajusté entre 6,0 et 6,1 par addition de KOH 1M. Une goutte de Tween 20 est ajoutée pour 20mL de solution.

## 3. Protocoles des modes d'introduction de la PHE\*

Les durées d'incubation varient de 1h à 30h. Les différentes modalités d'introduction sont représentées dans le **tableau 3**.

Racine		Feuille		
Plante entière	Organe	Organe	Plante entière	Plante entière
				
racines dans SNI	fragments racinaires dans SNI	feuille incubée avec SAI	infiltration de SAI	spray d'une solution marquée

**Tableau 3 : Tableau des modalités d'introduction de PHE\* testées.** Les organes ciblés sont surlignés en vert

### a- Incubation des racines (plante entière ou fragments racinaires)

**Les plantes entières** sont transférées dans des tubes de 40 mL remplis avec 30 mL de solution nutritive d'incubation (SNI). Au cours de l'incubation, une quantité suffisante de SNI est ajoutée pour compenser la perte par absorption.

Pour incuber des **fragments racinaires**, les racines sont coupées en fragments de 0,5 à 1 cm et immergées dans des tubes de 2 mL contenant 1mL de SNI.

### b- Incubation des feuilles (trempage, spray ou infiltration)

L'incubation des feuilles se fait par **trempage** d'une feuille excisée dans de la SAI : les feuilles sont sectionnées afin de récupérer les trois folioles terminales (1,2 et 3). Le rachis est coupé au ras des folioles 4 et 5. La feuille est immédiatement transférée dans des tubes de 2 mL contenant 1,8 mL de SAI. Environ 1cm du rachis trempe.

L'incubation est également réalisée par **spray** d'une solution de PHE\*. Le pulvérisateur produit des sprays de 315 µL environ. On applique deux sprays à la foliole terminale d'une feuille (une fois dessous et une fois dessus). On utilise les feuilles 3 et 4 (à partir du bas).

Une autre modalité d'incubation testée est l'**infiltration** foliaire : on utilise une seringue de 1mL et on infiltre le dessous de la foliole terminale d'une feuille avec 0,1mL de SAI (environ 6 points d'infiltration répartis). On utilise les feuilles 3 et 4.

#### c- Récolte des échantillons

Les échantillons sont récoltés immédiatement après incubation, emballés dans du papier aluminium, plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C. Les plantes entières sont séparées en parties racinaires et parties aériennes. Les folioles sont séparées en limbe et nervure (seule la nervure principale de chaque foliole est prélevée). Dans la suite, l'ensemble nervure-rachis-pétiole est nommé pétiole.

#### 4. *Extraction des composés phénoliques à partir des échantillons végétaux*

Les échantillons congelés sont lyophilisés jusqu'à séchage total puis pesés puis broyés. Les poudres sont conservées dans une étuve à 27°C. 50 mg de poudre sèche sont pesés dans un tube de 2 mL. La suite se fait à 4°C. Un millilitre de méthanol 60% est ajouté et l'ensemble est mélangé à l'ultra-turrax pendant 1min. Le tube est centrifugé 10 min à 5100 rpm. Le surnageant est récupéré. Sur le culot, on ajoute 1mL de méthanol 60% puis on mélange 1 min à l'ultra-turrax. On centrifuge 10 min à 5100 rpm puis on récupère le surnageant. Les deux surnageants sont rassemblés et évaporés au speed-vac une dizaine d'heures. Les extraits secs sont solubilisés par 300 µL d'eau additionnée de tyrosine (standard interne pour les dosages de PHE) à 0,17 g/L. On ajoute 650 µL de méthanol HPLC et 50 µL de taxifoline (standard interne pour les dosages des polyphénols) à 2 g/L puis on agite au vortex. On centrifuge 10 min à 12000 rpm puis on filtre sur nylon à 0,45 µm. Les extraits sont conservés à -20°C.

#### 5. *Analyses en HPLC-MS*

La séparation et le dosage de PHE, PHE\* et des polyphénols marqués et non marqués (rutine, kaempférol-rutinoside et ACG) sont réalisés à l'aide d'une HPLC (Thermo Scientific) couplée à un détecteur MS type LTQ (Thermo Scientific). Les données sont traitées avec le logiciel Xcalibur 2.1.

Pour la partie HPLC de PHE et des polyphénols, la colonne est une colonne C8-150 \* 2.1 mm (5µm) avec un débit de 0,2 ml/min et une température du four colonne de 25°C. Les phases mobiles sont pour la voie A de l'eau et HCOOH (0.1%) et pour la voie B du méthanol et HCOOH (0.1%).

Le programme HPLC pour la séparation de PHE est pour les temps suivants en min (% voie B) :0(10) ; 2(10) ; 8(20) ; 8,1(95) ; 13(95) ; 13,1(10) ; 19(10).

La détection MS de PHE et PHE\* se fait en ESI positif  $[M+H]^+$ . La PHE est suivie en SIM (Single Ion Monitoring) pour une masse de 166 et 8,5 min de temps de rétention. La PHE\* est suivie en SIM (masse 176 et 8,5 min). La méthode de quantification est réalisée avec la tyrosine (0,05g/L) comme standard interne en SIM (masse 182).

Le programme HPLC pour la séparation des polyphénols est pour les temps suivants en min (% voie B) :0(50) ; 6(68) ; 6,1(95) ; 11(95) ; 11,1(50) ; 16(50).

La détection MS des polyphénols se fait en ESI négatif  $[M-H]^-$ . Les polyphénols sont suivis en MS2 avec pour ACG (353,5→191 ; temps de rétention 2,9 min), pour ACG\* (362,5→191 ; 2,9 min), pour la rutine (609,5→301 ; 4,2 min), pour la rutine\* (618,5→285 ; 4,2 min), pour le kaempférol-rutinoside (593,5→285 ; 5,2 min), pour le kaempférol-rutinoside\* (602,5→295 ; 5,2 min). La méthode de quantification est réalisée avec la taxifoline (0,1g/L) comme standard interne en MS2 (303,5→241).

## 6. Suivi de l'umbelliférone dans la plante

Une solution d'umbelliférone à 0,2 g/L est préparée (avec 1% de DMSO : solvant organique nécessaire pour la mise en solution). Cette molécule étant fluorescente sous éclairage UV, elle est utilisée ici pour suivre visuellement la progression d'une molécule introduite dans la plante de la même façon que PHE\*. Les clichés sont pris sous éclairage UV avec un imageur.

## 7. Mesure de paramètres physiologiques

On utilise un système de mesure des échanges gazeux portatif (type LI-6400XT marque LICOR). Les mesures sont réalisées sur des plantes contrôles (dans leur bac de culture), sur des plantes entières incubées avec SNI et sur des folioles excisées incubées avec SAI. Dans tous les cas, la mesure se fait sur la foliole terminale de la feuille n°3 (en partant du bas). La chambre est éclairée par la lumière incidente (c'est-à-dire celle du phytotron où a lieu la culture) et la concentration imposée en CO<sub>2</sub> est de 400 ppm. Deux paramètres physiologiques sont présentés dans la partie résultats : l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> (en  $\mu\text{Mol CO}_2/\text{m}^2/\text{s}$ ) et la transpiration ( $\text{mmol H}_2\text{O}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

## 8. Expression des gènes par Rt-PCR

Les extractions d'ARN sont réalisées à l'aide du kit « RNeasy » (Qiagen). L'ADN résiduel est éliminé grâce au kit « RNase-Free DNase Set » (Qiagen). On teste ensuite la qualité des ARN sur gel d'agarose. L'ARN est dosé avec un spectrophotomètre (Biophotometer Eppendorf).

L'ADNc est synthétisé à l'aide du kit «High capacity cDNA reverse Transcription» (Applied Biosystems) à partir de 500 ng d'ARN par échantillon puis dilué 10 fois.

La PCR en temps réel est réalisée sur une machine ABI Stepone Plus (Applied Biosystems) avec du SybrGreen pour la détection. Le volume réactionnel est de 20  $\mu\text{L}$  avec 10  $\mu\text{L}$  de qPCR Master Mix (Applied Biosystems) et 5  $\mu\text{L}$  d'ADNc. Les concentrations des amorces sont données dans le **tableau 4**. Les cycles de polymérisation s'effectuent dans les conditions suivantes : 10 min à 95°C puis 40 cycles alternant entre 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C. L'expression de chaque gène est calculée à partir de deux échantillons répétés avec trois réplicats techniques. Le gène de référence est le gène EF1 $\alpha$  (Elongation Factor 1  $\alpha$ ) (Løvdal *et al.*, 2009). F3'H n'est pas suivi pour les racines (celle-ci ont une faible teneur en flavonoïdes).

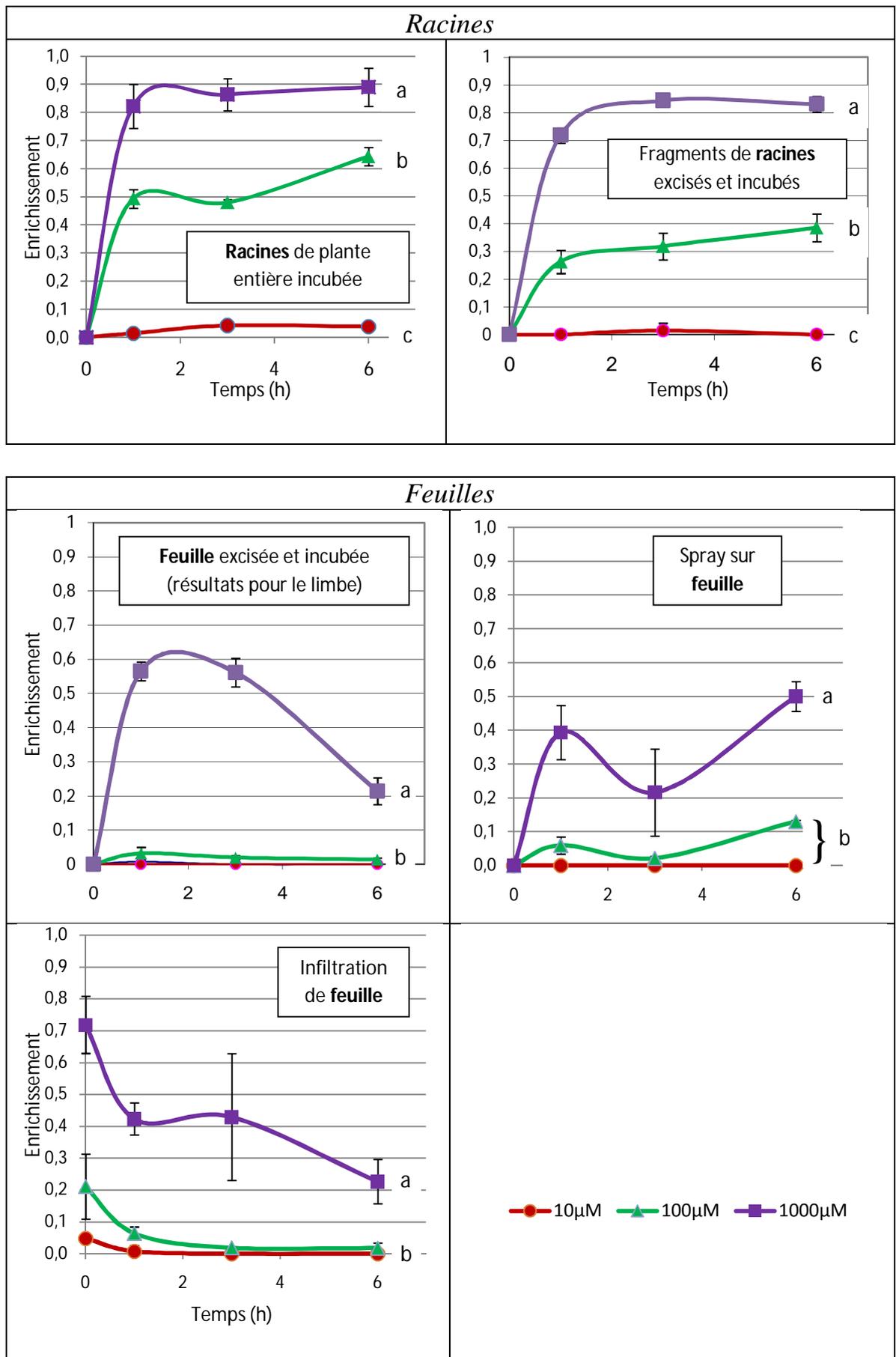
Gène	Séquence des amorces 5'-3'	Concentration ( nM)	Référence
EF1 $\alpha$	F: GGAAC TTGAGAAGGAGCCTAAG R: CAACACCAACAGCAACAGTCT	F: 300 R: 150	Løvdal <i>et al.</i> , 2009
PAL5	F: TTTCTCCATTACAAATCAAACCA R: TTCACTTCATCCAAATGACTCC	F: 300 R: 300	Løvdal <i>et al.</i> , 2010
F3'H	F: GAGGAGTTCAAGTTAATGGTGGT R: ACTCGCTTTTCCTTGTGTTCTT	F: 300 R: 300	Løvdal <i>et al.</i> , 2010
SIMYB12	F: GAGCAATAATGTAGGGAATAG R: TTGAAGTAAGTTAGTGTCAGTAT	F: 300 R: 600	Olsen <i>et al.</i> , 2009

**Tableau 4 : Détail des amorces utilisées pour la Rt-PCR**

## 9. Statistiques

Les tests statistiques sont réalisés avec le logiciel R version 2.12.1. Le nombre de répétitions étant faible (4 le plus souvent), le test de Kruskal-Wallis a été utilisé puis le test *ad hoc* de Tukey HSD en cas de différence significative au seuil de 0,05.

Dans tous les graphiques, les barres d'erreur sont les écart-types (sauf indication contraire). Les lettres indiquent des différences significatives des moyennes au temps final (6h sauf indication contraire).



**Figure 3: Enrichissement de PHE des racines et des feuilles en fonction du temps d'incubation à différentes concentrations de PHE\* selon les différents modes d'introduction testés. n=4 sauf pour l'infiltration (n=3).**

# Résultats

## 1. Enrichissement de PHE

Dans un premier temps, nous avons évalué l'efficacité d'entrée de la PHE\* dans l'organe visé pour chaque modalité et en considérant 3 concentrations en PHE\* représentant une large gamme (10/100/1000 $\mu$ M). Pour cela, nous avons réalisé une cinétique d'enrichissement du pool de PHE avec de la PHE\*. L'enrichissement est le rapport de la quantité de molécule marquée sur la quantité totale de molécules :  $\text{enrichissement PHE} = \frac{[\text{PHE}^*]}{[\text{PHE}] + [\text{PHE}^*]}$ .

Les résultats de l'enrichissement de PHE (**figure 3**) nous permettent de déterminer l'importance et la vitesse d'incorporation ainsi que la stabilité du marquage de l'organe.

Pour les racines, les deux modalités testées (plante entière ou racines excisées) fournissent des enrichissements comparables. L'enrichissement est faible ou nul pour des incubations à 10 $\mu$ M de PHE\*. Pour les concentrations de 100 et 1000 $\mu$ M, les courbes présentent une phase de croissance rapide jusqu'à 1h environ puis une phase en plateau. Pour cette dernière, les valeurs se situent entre 0,8 et 0,9 pour la teneur la plus élevée en PHE\*. Elles se situent entre 0,3 et 0,6 pour une concentration de 100 $\mu$ M en PHE\*. A ces concentrations, le marquage est donc stabilisé dès 1h d'incubation. Ces deux méthodes présentent ainsi des enrichissements satisfaisants de PHE tant du point de vue de l'intensité que de la stabilité dans le temps. C'est l'incubation de plantes entières qui est choisie pour les investigations suivantes car elle implique une manipulation minimale de la plante (seulement un changement de bac) ; contrairement à l'excision des racines en fragments. D'autres mesures (non montrées) indiquent un enrichissement stable à (0,5) jusqu'à 24h (avec 100 $\mu$ M de PHE\*) avec cette modalité.

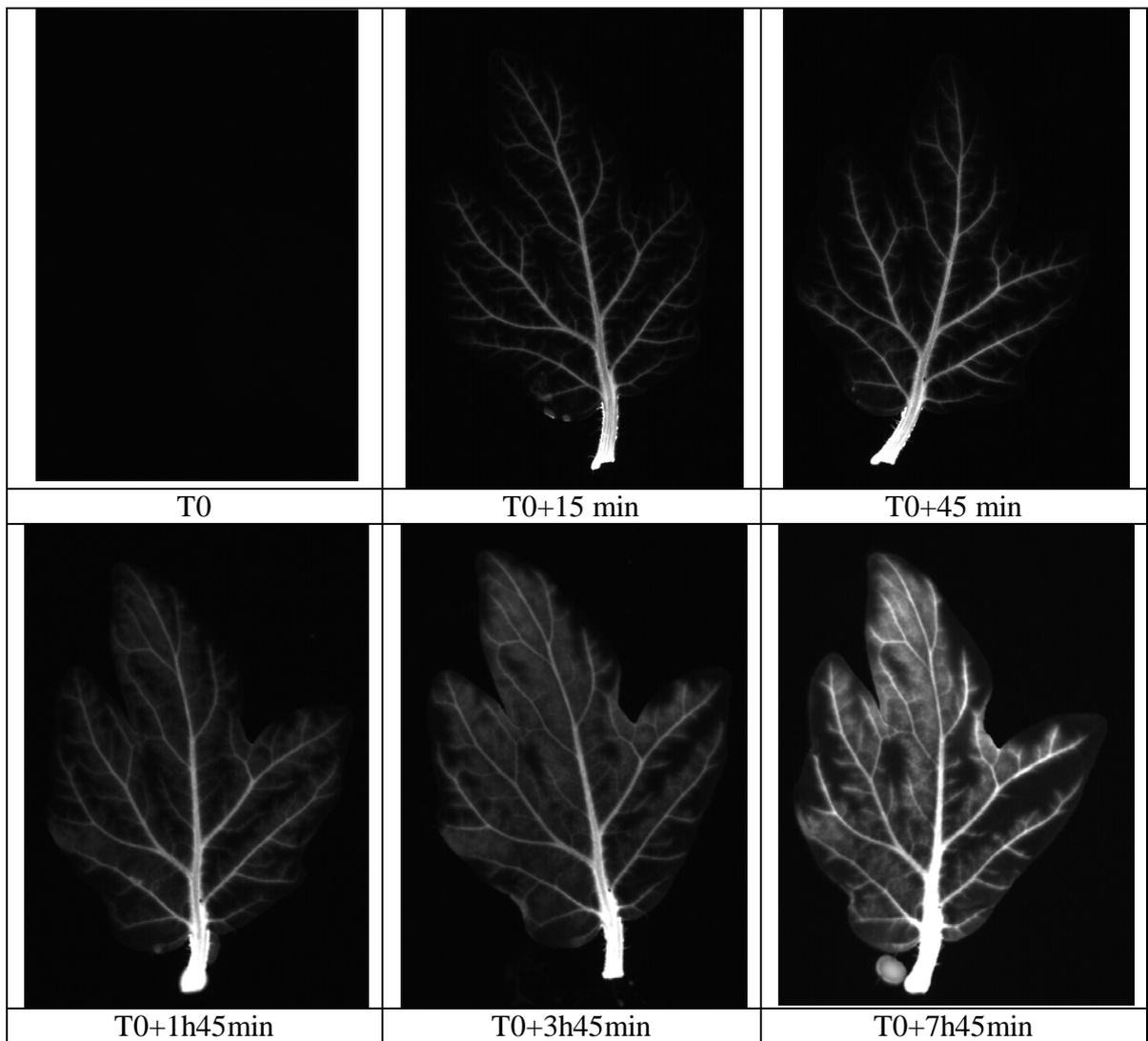
Pour les feuilles, les 3 modalités présentent des défauts dans leur profil d'enrichissement.

L'incubation de feuilles excisées donne un enrichissement du limbe qui atteint rapidement (1h) un niveau de 0,5 (avec 1mM de PHE\*) qui se maintient jusqu'à 3h et décline ensuite jusqu'à un niveau faible (0,2) à 6h. Cette chute est due en particulier à un effet de dilution lié à une augmentation importante du pool naturel de PHE (**figure 8**).

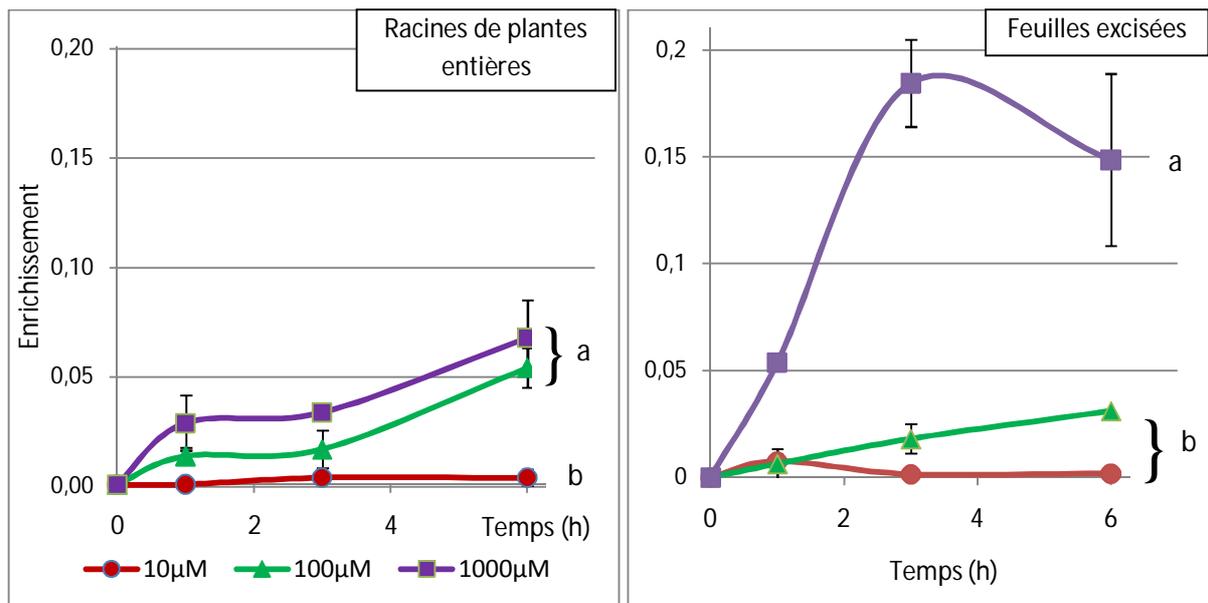
L'introduction par le spray donne un enrichissement maximal de 0,5 mais celui-ci est irrégulier dans le temps.

L'infiltration de PHE directement dans les feuilles induit un enrichissement important (0,7) à T0 mais qui décline rapidement (0,2 à 6h).

Au regard de ces résultats, nous avons décidé de ne poursuivre les expérimentations qu'avec seulement la modalité utilisant des feuilles excisées. Même si son profil d'enrichissement n'est pas parfait, nous souhaitons favoriser une modalité où l'introduction de PHE se fait directement au niveau de la feuille.



**Figure 4: Photographies sous éclairage UV d'une foliole excisée de feuille de tomate dont l'extrémité du rachis est placée dans une solution d'umbelliférone (0,02 g/L).**



**Figure 5 : Enrichissement de ACG des racines de plantes entières et des limbes de feuilles excisées en fonction du temps d'incubation à différentes concentrations de PHE\*. n=4**

## 2. Homogénéité spatiale du marquage

Une des difficultés du marquage des tissus végétaux réside dans l'obtention d'un marquage homogène du tissu. Cette difficulté est habituellement contournée en utilisant des tissus excisés et homogènes.

Pour suivre l'homogénéité de la répartition de la PHE\* dans les organes ciblés, nous avons tenté de suivre par fluorescence la PHE. Mais celle-ci présente une fluorescence aux UV nettement trop faible pour aboutir à un résultat visible. L'umbelliférone est une coumarine à 2 cycles (9 carbones). En tant que polyphénol, elle dérive de PHE. Son comportement dans la plante est donc supposé proche, grâce à une physico-chimie proche. Pour tester l'homogénéité du marquage, de l'umbelliférone est donc administrée à la plante (ou à la feuille) dans les mêmes conditions que celles définies pour l'introduction de PHE\*.

Les résultats pour la feuille excisée (**figure 4**) montrent que l'umbelliférone pénètre rapidement dans la feuille (dès 15 min) et irrigue la totalité de l'organe en quelques heures. Néanmoins, les nervures contiennent plus d'umbelliférone que le reste du limbe.

Les résultats pour les racines de plantes entières sont comparables (non montrés) : la pénétration de l'umbelliférone est rapide ; elle augmente au cours du temps et elle est un peu supérieure dans les parties distales des racines.

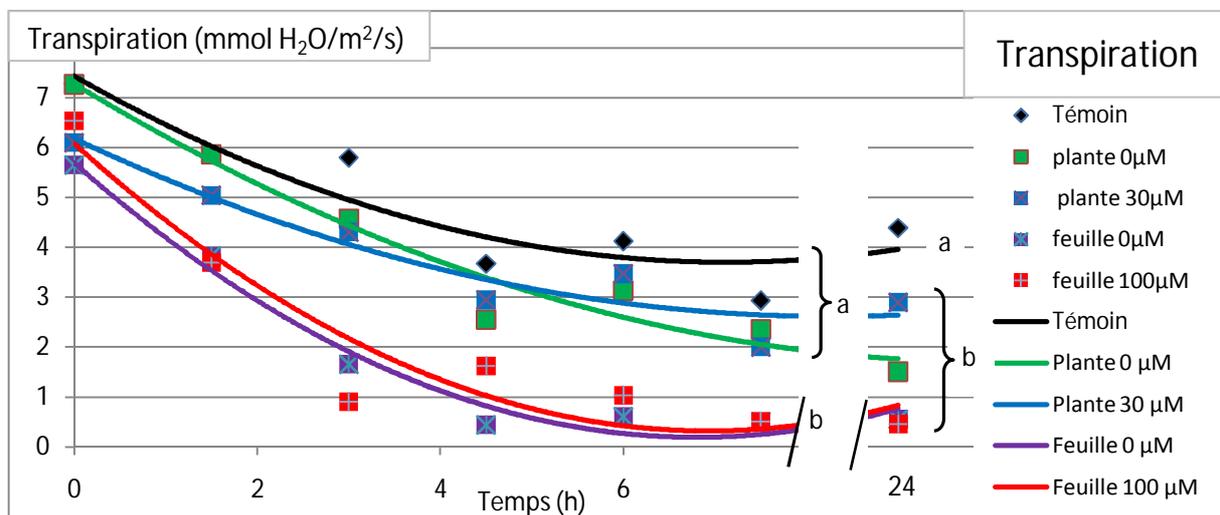
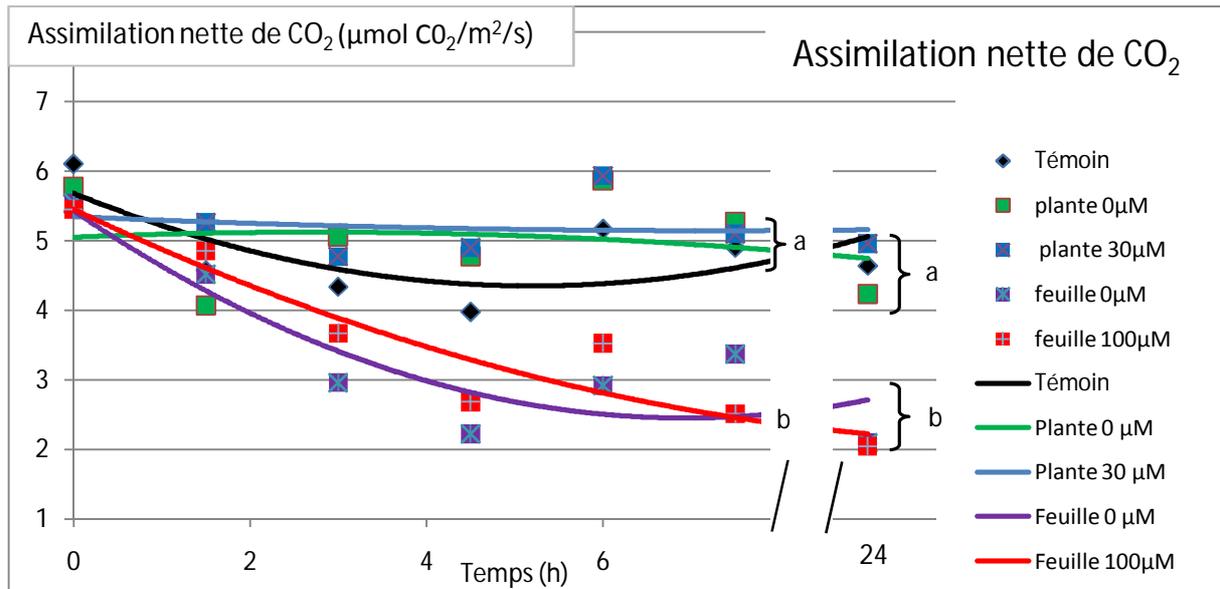
## 3. Enrichissement des polyphénols\*

L'étude de l'enrichissement des polyphénols pour les deux modalités retenues permet d'affiner notre choix, en particulier vis-à-vis de la concentration en PHE\* optimale. L'enrichissement des polyphénols a été suivi au cours du temps avec trois concentrations de PHE\*. La **figure 5** présente le résultat pour ACG. Les autres polyphénols étudiés (rutine et kaempférol-rutinoside) présentent un enrichissement nul ou négligeable.

Pour la modalité racine, nous détectons l'apparition d'un marquage dans le pool de ACG ; quelque soit la concentration de PHE\* utilisée. Ce marquage est très faible avec la concentration de PHE\* de 10 $\mu$ M. Pour les deux plus fortes concentrations de PHE\*, l'enrichissement obtenu n'est pas significativement différent et augmente au cours du temps.

Pour la modalité feuille excisée, un marquage significatif est obtenu dans le pool d'ACG quelque soit la concentration de PHE\* utilisée. Néanmoins la concentration forte de PHE\* (1mM) donne un marquage significativement plus fort que les autres concentrations.

On note dans les deux modalités un décalage dans le temps de l'enrichissement maximal de l'ACG par rapport à la courbe d'enrichissement de PHE (environ 1h de décalage).



**Figure 6 : Evolution des paramètres physiologiques (assimilation et transpiration) de folioles suivis au cours de l'incubation de plantes entières et de feuilles excisées incubées par PHE\* à différentes concentrations.** Les points sont les points expérimentaux, les courbes sont les courbes de tendance polynomiale. La période d'interruption correspond à la période obscure du phytotron. Les lettres indiquent des différences significatives aux temps 7,5h et 24h. n=4

#### 4. *Suivi des perturbations engendrées par l'incorporation de PHE\**

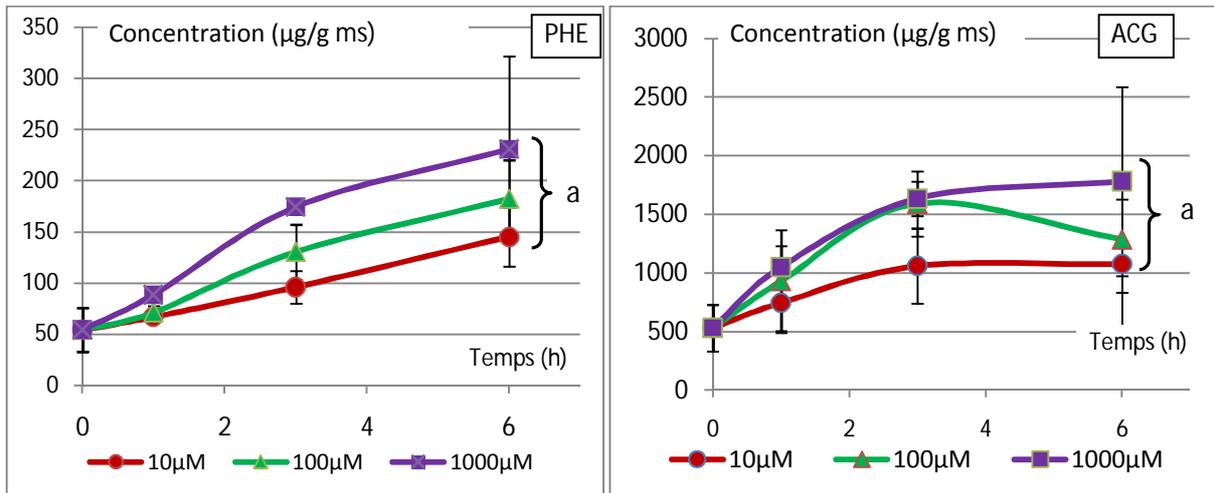
##### a- Suivi de paramètres physiologiques

Pour savoir si les modalités retenues modifient la physiologie des organes ciblés, deux paramètres physiologiques (assimilation nette de CO<sub>2</sub> et transpiration) ont été suivis au cours du temps. Ce suivi a été réalisé pendant une incubation par PHE\* selon les deux modalités retenues, à savoir : plante entière pour les racines et feuille excisée pour les feuilles. Deux paramètres relevés au niveau des folioles sont présentés ci-après ; soit pour des témoins dans leur bac de culture (aucune modification), soit pour des plantes entières incubées dans de la SNI ou soit pour des folioles excisées incubées dans de la SAI.

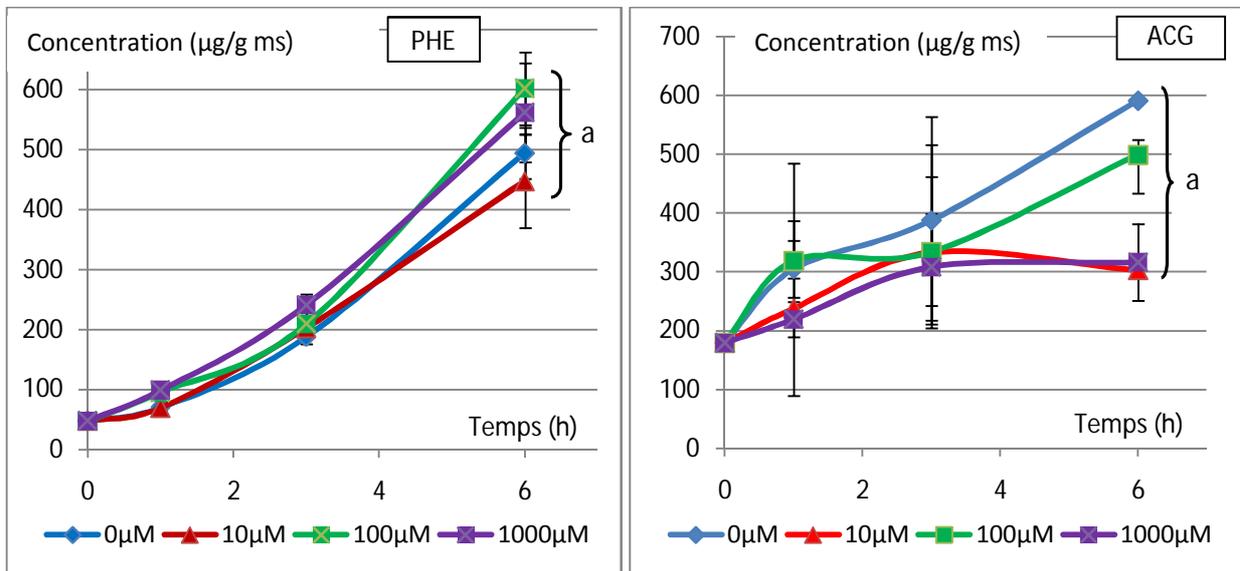
L'assimilation de CO<sub>2</sub> au cours du temps des plantes entières incubées reste au niveau de celle des témoins. L'assimilation des feuilles excisées devient au cours du premier jour significativement inférieure à celle des plantes entières et des témoins (diminution d'environ 50% à 7,5h).

Au cours de l'expérimentation, la transpiration des feuilles excisées et incubées diminue, devient rapidement inférieure à celle des témoins et tend vers 0. A partir de 6h d'incubation, cette transpiration est presque nulle. La transpiration des plantes entières incubées reste au niveau de celle des témoins le premier jour mais elle devient inférieure lors de la mesure du deuxième jour (à 24h d'incubation). Les mesures de conductance stomatique (non montrées) suivent les courbes de la transpiration. La diminution de la transpiration des témoins au cours du premier jour est probablement liée à une baisse de la température dans le phytotron (diminution de 2°C en 6h).

La concentration en PHE\* du milieu d'incubation n'a pas d'effet sur ces paramètres physiologiques. Durant le premier jour et à la lumière des paramètres étudiés, la physiologie des plantes entières ne parait pas perturbée ; contrairement à celle des feuilles excisées dont les fonctions de base deviennent très faibles.



**Figure 7 : Pools naturels de PHE et de ACG des racines en fonction du temps d'incubation pour des plantes entières placées dans de la SNI à différentes concentrations de PHE\*. n=4**



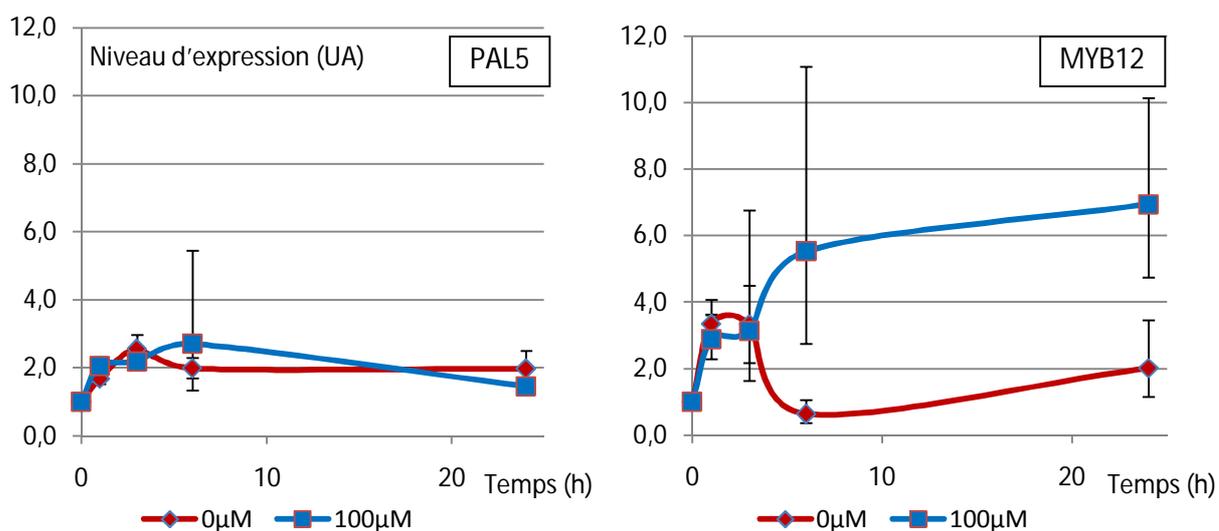
**Figure 8 : Pools naturels de PHE et de ACG des limbes des feuilles excisées en fonction du temps d'incubation à différentes concentrations de PHE\*. n=4**

## b- Evolution des pools de métabolites naturels

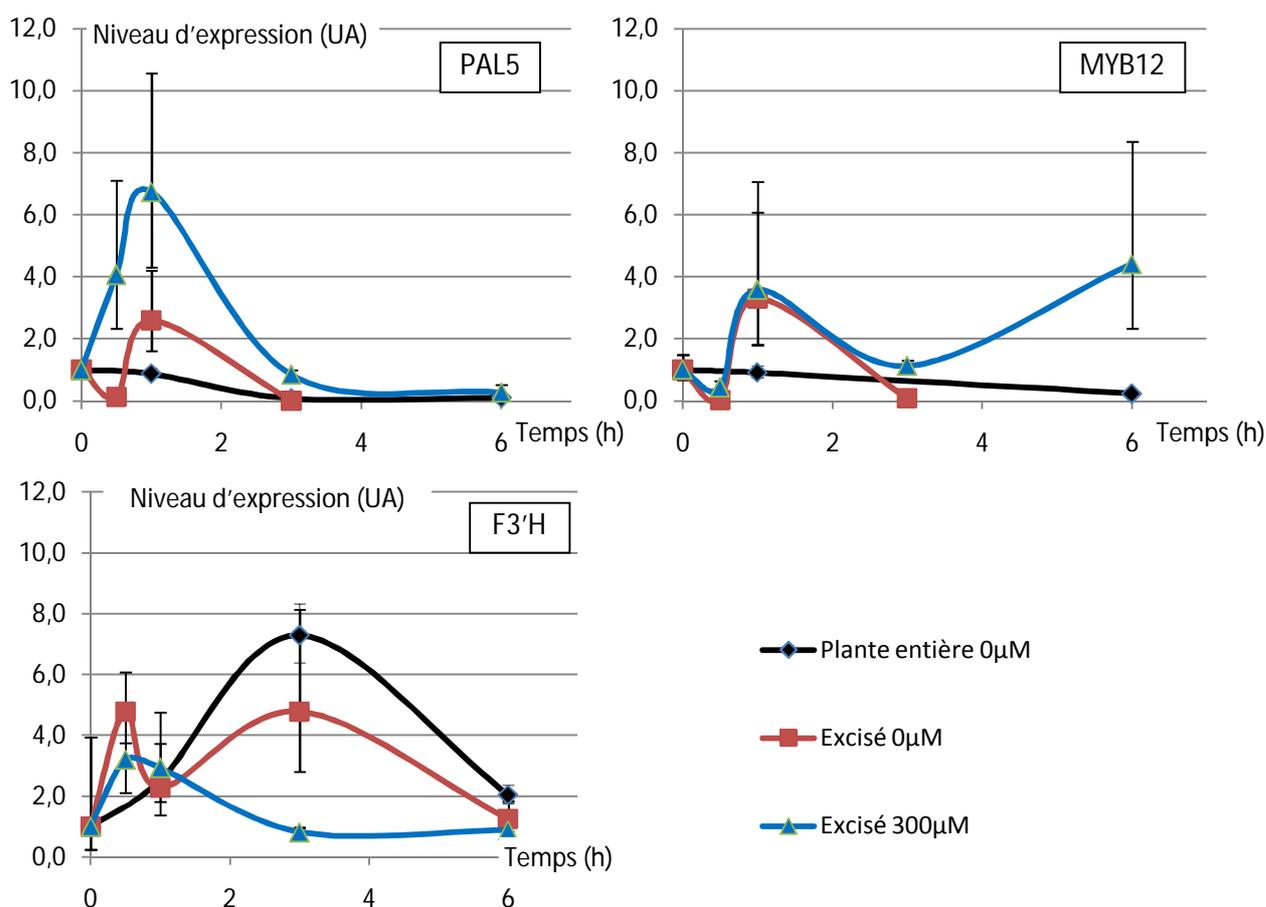
Nous souhaitons également savoir si les techniques d'incorporation de PHE\* modifient les niveaux métaboliques au sein de la voie des polyphénols. Pour cela PHE est dosé ainsi que trois polyphénols (ACG, rutine et kaempférol-rutinoside).

Pour la modalité racine, Le pool de PHE des racines augmente pendant l'expérimentation (x3 à x4). Il n'y a pas de différence significative entre les différentes concentrations d'incubation de PHE\*. Les polyphénols dosés (résultats pour ACG : **figure 7**) ont des concentrations qui ont tendance à augmenter au cours du temps (x2 à x3). C'est le cas aussi de la rutine et du kaempférol-rutinoside mais ceux-ci ont tendance à revenir à leur niveau de base (données non montrées). Dans le cas de la racine, l'incubation augmente globalement les pools des métabolites dosés, mais de façon modérée et transitoire pour certains polyphénols.

Le pool de PHE dans les limbes de feuille augmente drastiquement (jusqu'à x12) au cours de l'expérimentation. Cette augmentation est identique quelque soit la concentration en PHE\*. Les pools de polyphénols (résultats pour ACG : **figure 8**) augmentent aussi mais de façon plus modérée (x1,5 à x3).



**Figure 9 : Suivi de l'expression des gènes PAL5 et MYB12 en fonction du temps pour des racines de plantes entières incubées avec et sans PHE\*. Les extrémités des barres indiquent la valeur minimale et la valeur maximale. n=2**



**Figure 10 : Suivi de l'expression des gènes PAL5, MYB12 et F3'H en fonction du temps pour des feuilles de plantes entières et des feuilles excisées et incubées avec ou sans PHE\*. Les extrémités des barres indiquent les valeurs minimale et maximale. A temps=0, la plante entière est transférée de son bac de culture à un tube d'incubation (0 µM PHE\*). n=2**

### c- Suivi de l'expression de gènes

Un autre paramètre qui a été suivi pour évaluer l'impact des techniques d'incorporation de PHE est le niveau d'expression de gènes impliqués dans la voie des polyphénols.

Pour les racines (**figure 9**), l'expression du gène PAL5 ne semble pas modifiée pendant l'incubation entre le témoin et les individus incubés à 100 $\mu$ M de PHE\*. L'expression du gène du facteur de transcription MYB12 a tendance à augmenter légèrement chez le témoin (0 $\mu$ M PHE\*) de 1 à 3h après la mise en place dans le tube d'incubation. Le niveau d'expression revient ensuite à la valeur initiale. Dans le cas de l'incubation avec une concentration de PHE\* de 100 $\mu$ M, on observe une tendance à une augmentation rapide puis plus lente de l'expression par rapport au témoin.

Pour les feuilles (**figure 10**), l'expression du gène PAL5 varie, contrairement à la racine. Par rapport au témoin (plante non excisée) pour lequel l'expression est assez stable au cours du temps, les modalités de feuilles excisées présentent un pic de l'expression de PAL5 pendant les trois premières heures. Ensuite, le niveau d'expression rejoint celui du témoin. L'amplitude du pic d'expression est plus importante pour la modalité incubée à 300 $\mu$ M que pour la modalité excisée et incubée à 0 $\mu$ M PHE\*.

Le profil d'expression du gène MYB12 dans la feuille ressemble à celui de PAL5. L'expression chez le témoin est stable. Les modalités de feuilles excisées présentent un pic d'expression pendant les trois premières heures. Concernant ce pic, il n'y a pas de différence entre la modalité excisée et incubée à 0 $\mu$ M et celle qui est excisée et incubée à 300 $\mu$ M de PHE\*.

Pour le gène de F3'H dans la feuille, l'expression chez le témoin non excisé augmente régulièrement jusqu'à 3h puis diminue jusqu'à 6h. Pour la modalité excisée et incubée à 0 $\mu$ M, on note le même profil mais avec une amplitude moindre (x5 par rapport à l'expression à T0 contre x7 pour le témoin). De plus cette modalité présente un pic d'expression à 30 min. La modalité excisée et incubée à 300 $\mu$ M présente également ce pic d'expression à 30 min puis le niveau d'expression revient au niveau initial à 3h.

## Discussion

### 1. Choix de la méthode d'incorporation de PHE\* pour les racines

La méthode retenue pour les racines est l'incubation de plantes entières par une SNI. En effet, nous avons vu pour cette modalité que:

- la PHE\* entre rapidement et que cette entrée est stable dans le temps (après 1h),
- le marquage de l'organe semble homogène,
- les fonctions physiologiques de la plante ne sont pas altérées,
- il n'y a pas ou peu de perturbations de la voie métabolique (au niveau de l'expression des gènes ou des teneurs en métabolites).

La modalité avec des racines excisées ne donne pas de mauvais résultats mais la modalité avec des plantes entières lui est préférée pour préserver le fonctionnement global de la plante. Celle-ci présente l'intérêt d'éviter toute coupure et la manipulation se limite à transférer la plante d'un bac de culture à un tube d'incubation. Le suivi physiologique (**figure 6**) montre que les grandes fonctions à l'échelle de la plante ne sont pas affectées pendant au moins 8h.

Les niveaux d'enrichissement obtenus sont fonctions de la concentration en PHE\* présente dans la SNI (**figure 3**). Une concentration de 10 $\mu$ M donne un enrichissement modéré de 0,04. Le pool de PHE est donc marqué mais faiblement augmenté. Une concentration de 100 $\mu$ M donne un enrichissement de 0,5. Dans cette situation, le pool total de PHE est doublé. L'enrichissement devient très important (0,9) avec une concentration d'incubation de 1mM. Matsuda *et al.* (2003) ont obtenu un enrichissement inférieur (0,75) sur des fragments de tubercule de pomme de terre avec une concentration de PHE\* (marquée au deutérium) supérieure (10mM). On peut considérer que le niveau d'enrichissement est stabilisé dès 1h d'incubation (idem pour Matsuda *et al.* (2003)).

Le suivi de l'umbelliférone absorbée par la racine montre qu'elle pénètre rapidement les racines et irrigue la totalité de l'organe en 15 min. Par contre, on observe un léger différentiel entre le marquage supérieur des parties jeunes par rapport aux parties plus âgées. De plus, l'umbelliférone reste une molécule différente de PHE ; l'absorption et la circulation de cette dernière sont probablement favorisées par des systèmes de transport spécifiques (Fisher *et al.*, 2002). L'homogénéité spatiale du marquage n'a pas été testée avec PHE\*. Il aurait été possible de séparer pour les analyses les parties jeunes (qui absorbent) des parties plus anciennes (n'absorbant plus). Mais les plants étant exploités à un stade jeune (4 semaines) et la culture croissant en hydroponie, la majorité de la masse racinaire est constituée de racines fines. L'ensemble paraissait donc homogène et aucune distinction n'a été faite lors de la récolte des racines. Néanmoins, l'homogénéité du marquage pourrait être testée par autoradiographie après une incubation par de la PHE comportant un <sup>14</sup>C (comme réalisé sur le pétale de pétunia par Boatright *et al.*, 2004).

Les polyphénols présentent un enrichissement assez faible ou négligeable (**figure 5**). L'acide chlorogénique est enrichi au maximum à 0,05 avec 100 $\mu$ M de PHE\* (pas de différence significative avec 1mM de PHE\*). Avec 10 $\mu$ M de PHE\*, l'enrichissement est négligeable. Matsuda *et al.* (2005) ont obtenu un enrichissement maximal de 0,09 (mêmes conditions que *infra*). Entre PHE et ACG, l'enrichissement est divisé par un facteur supérieur à 10. La rutine et le kaempférol-rutinoside ne sont pas (ou très peu) enrichis. Même un enrichissement très fort de PHE (à 0,9) ne conduit pas à un enrichissement suffisant des produits situés nettement en aval (la rutine par exemple). L'incubation à 100 $\mu$ M de PHE\* permet un enrichissement suffisant d'une partie de la voie métabolique comprenant PHE et l'acide chlorogénique ; c'est-à-dire la branche des phénylpropanoïdes. La branche comprenant la rutine et le kaempférol-rutinoside (les flavonoïdes) n'est pas suffisamment marquée. Ceci pourrait s'expliquer notamment par la dilution de l'enrichissement au fil de la voie métabolique (**figure 1**) et par des différences quantitatives entre les branches de cette voie. De plus, le renouvellement des polyphénols est

faible (Macheix *et al.*, 2005), ce qui rend difficile leur marquage à court terme. D'un point de vue pratique, la préparation des échantillons ne nous a pas permis de détecter de marquage dans les pools de rutine et de kaempférol-rutinoside. A l'avenir, nous pourrions procéder à une préparation d'échantillon différente, de façon à concentrer les polyphénols dans l'extrait et permettre la visualisation de l'enrichissement (par exemple utiliser plus de matériel végétal ou reprendre l'extrait sec dans moins de méthanol).

L'inconvénient de cette méthode est l'augmentation du pool naturel de PHE (x3 à x4 à 6h) (**figure 7**). Il s'agit probablement d'une réaction de la plante à la manipulation (transfert d'un récipient à un autre) et à l'incubation dans un tube nettement plus petit que le bac de culture (40mL contre 1L par plante). Des mesures réalisées sur 24h montrent toutefois une diminution lente après 6h (données non montrées). Le pool de polyphénols augmente lui aussi pendant l'incubation mais dans une moindre mesure et on note une tendance au retour au niveau de base dès 3h (**figure 7**). L'étape de transfert pourrait être améliorée en conduisant la culture et l'incubation dans des volumes identiques ; ou même en introduisant la PHE\* directement dans le milieu de culture. Ceci réduirait les manipulations et les blessures sur les racines.

Du point de vue de l'expression des gènes étudiés (**figure 9**), l'expression du gène PAL5 ne paraît pas perturbée alors que MYB12 a tendance à être surexprimé suite au marquage. La perturbation à ce niveau paraît donc modérée mais il sera nécessaire de compléter ces données par des mesures pour au moins un gène de la voie des phénylpropanoïdes ; par exemple les gènes de HQT ou C3'H situés en amont de ACG (**figure 1**).

Finalement, la modalité choisie se fera idéalement avec une concentration en PHE\* de 100µM, c'est la concentration minimale qui permet un marquage satisfaisant de PHE et ACG.

## 2. Choix de la méthode d'incorporation de PHE\* pour les feuilles

Les résultats obtenus nous montrent que la définition d'une modalité de marquage du compartiment foliaire est plus délicate que dans le cas des racines.

La première difficulté vient du fait que les niveaux d'enrichissement ne sont pas homogènes selon les tissus de la feuille. Les parties conductrices (rachis et nervures) sont plus enrichies en PHE\* que les parties assimilatrices (limbe) avec un facteur supérieur à 2 (données non montrées). La courbe d'enrichissement de l'ACG présente une allure similaire à celle de l'enrichissement de PHE mais elle est inférieure et légèrement décalée dans le temps. Ceci s'explique par sa position en aval par rapport à PHE dans la voie métabolique des polyphénols (**figure 1**). Le suivi par l'umbelliférone permet d'aboutir aux mêmes conclusions quant au différentiel de marquage entre nervure et limbe. Il indique néanmoins que le limbe est correctement et totalement irrigué par la molécule introduite en 2 à 3h (**figure 4**).

Malgré cette difficulté, et au vu des résultats d'enrichissement de PHE (**figure 3**), la méthode que nous avons retenue pour le marquage du compartiment foliaire était l'incubation de feuilles excisées dans de la SAI. Cette approche a été préférée au spray et à l'infiltration. Dans le cas de ces derniers, l'introduction de PHE\* est ponctuelle à T0 et l'enrichissement ne se maintient pas au cours du temps ou alors devient irrégulier.

Pour avoir un niveau d'enrichissement suffisant dans le limbe pour PHE (environ 0,4) et ACG (0,15), il est nécessaire d'incuber la feuille avec une forte concentration en PHE\* (1mM) (**figures 3 et 5**). Malheureusement, cette concentration ne suffit pas à marquer les polyphénols situés dans la branche des flavonoïdes (rutine et kaempférol-rutinoside).

Cette méthode cause de fortes perturbations physiologiques et métaboliques. Au niveau des paramètres physiologiques, la transpiration chute à des niveaux proches de zéro (**figure 6**); ce qui diminue donc l'entrée de PHE\* dans l'organe et empêche l'homogénéité du marquage dans le temps. L'assimilation de CO<sub>2</sub> est également touchée mais dans une moindre mesure. A 24h, ces perturbations persistent.

Un autre inconvénient de cette technique d'incubation réside dans les modifications apportées par l'excision. Au niveau du pool de PHE (**figure 8**), on constate une augmentation importante et rapide (jusqu'à x12 à 6h) qui pourrait être expliquée par une modification du bilan net de cet acide aminé dans la feuille. Au niveau des feuilles matures d'une autre espèce (lupin), l'entrée de PHE par le xylème est très faible (non détectable) alors que la sortie par le phloème est quantifiable. (Atkins *et al.*, 1983). Le bilan est donc une exportation nette de PHE. Suite à la coupure, les flux de sève sont modifiés ; avec vraisemblablement une baisse relative du flux de sève sortant menant donc à une diminution des sorties de PHE de la feuille. Ceci peut donc expliquer l'accumulation de PHE dans la feuille excisée. Boatright *et al.* (2004) ont également noté cet effet (x30 à 4h) avec des conditions proches (incubation de pétales excisés de pétunia par PHE marquée au deutérium). C'est un inconvénient car cela empêche la stabilité de l'enrichissement et risque de modifier les flux métaboliques de la voie des polyphénols.

Du point de vue de l'expression de gènes impliqués dans la voie métabolique (**figure 10**), on relève des modifications nettes (inhibition ou stimulation) par rapport au témoin pour les trois gènes considérés. Nos données vont dans le sens de résultats déjà publiés : l'apport exogène de PHE stimule l'expression de gènes de la voie des phénylpropanoïdes (dont PAL) dans des cultures cellulaires liquides de *Pinus taeda* (Anterola *et al.*, 2002). L'expression du gène PAL augmente légèrement quand les pétales de pétunia sont excisés et incubés avec PHE marquée par rapport à des pétales non excisés et non incubés (Boatright *et al.*, 2004). On observe chez le témoin une variation de l'expression du gène de F3'H qui augmente puis diminue régulièrement sur une période de 6h (**figure 10**). F3'H étant une enzyme impliquée dans la branche des flavonoïdes et des enzymes de cette voie étant positivement régulées au niveau transcriptionnel par la lumière (Gautier *et al.*, 2008), il est possible que l'on ait ici le reflet d'un rythme nyctéméral.

Il serait souhaitable de compléter ces informations par des mesures d'activités enzymatiques pour savoir si elles sont modifiées par la méthode d'incubation. On peut cibler en particulier la PAL (première enzyme de la voie et dont le substrat est la PHE). Son activité a déjà fait l'objet de mesures par Boatright *et al.* (2004) sur le pétale de pétunia.

La méthode d'introduction de PHE\* dans des feuilles excisées présente donc différents défauts : un enrichissement hétérogène selon les tissus et instable dans le temps ainsi que des perturbations physiologiques et métaboliques importantes. Cette modalité doit donc être écartée.

Par conséquent, une alternative pour le marquage des feuilles pourrait être l'incubation de racines de plantes entières en vue de marquer les feuilles. Il s'agit de la même modalité que celle retenue pour les racines mais l'organe ciblé est différent. Ce mode d'introduction a été initialement écarté car les acides aminés prélevés par les racines peuvent être métabolisés à leur niveau ; avant d'atteindre le xylème puis les feuilles (Näsholm *et al.*, 2009). Cette modalité présente l'avantage de perturbations physiologiques faibles (**figure 6**) et permet donc des incubations plus longues (24h). De plus, les niveaux des métabolites PHE et polyphénols présentent peu de variations (données non montrées). Il serait intéressant de savoir si PHE\* est métabolisée entre son absorption dans les racines et son arrivée dans les feuilles. Y a-t-il entrée dans la feuille de molécules marquées au <sup>13</sup>C autres que la PHE\* ? Si l'on prend l'exemple de l'ACG chez *Coffea canephora*, il circule bien dans le phloème mais dans le sens des jeunes feuilles où il est synthétisé vers les feuilles matures (Mondolot *et al.*, 2006). Dans ce cas précis, cela ne pose pas de problème. Néanmoins, des prélèvements de sève au niveau du pétiole pourraient aider à répondre plus largement à cette question.

## Conclusion

La tomate est le deuxième légume le plus consommé à l'échelle mondiale. Sa protection vis-à-vis des bio-agresseurs est donc un enjeu d'importance. Les techniques actuelles de protection reposent en grande partie sur l'utilisation de produits phytosanitaires. Dans le contexte de la demande de plus en plus forte d'un recours modéré ou nul à la chimie de synthèse, une voie possible est l'optimisation des défenses intrinsèques de la plante, notamment en agissant sur l'environnement de la culture. Le rôle des polyphénols dans ces processus de défense sont connus, mais la modélisation des effets environnementaux sur le métabolisme de ces composés secondaires reste à mettre au point. Les études de fluxomique devraient aboutir à l'obtention de modèles fiables et fidèles aux conditions *in planta*.

Cette étude avait pour objectif le choix et la mise au point d'une méthode d'incorporation du précurseur marqué dans la voie des polyphénols. Les résultats présentés ci-avant permettent d'éclairer ce choix. La multiplicité des approches (biochimie isotopique, physiologie, quantification transcriptionnelle) permet une approche globale du système ; à différentes échelles. Ceci est nécessaire pour valider une méthode qui doit perturber au minimum la plante. En effet, les études de fluxomique visent à connaître l'état naturel ainsi que l'effet de facteurs environnementaux sur cet état de référence.

Les résultats montrent que l'incubation d'une plante entière avec 100 $\mu$ M de PHE\* donne des résultats satisfaisants pour ce qui est du marquage de la voie métabolique au niveau des racines. Par contre, la technique d'incubation de feuilles excisées fournit des résultats plutôt décevants. Des études antérieures ont été réalisées sur des organes excisés (Boatright *et al.*, 2004) et qui ne sont incubés qu'après une période de stabilisation métabolique (Matsuda, 2005). Cette dernière approche ne sera vraisemblablement pas explorée car les dommages causés à la feuille par l'excision paraissent irréversibles (perte de la transpiration). Il sera nécessaire de se tourner vers l'introduction de PHE\* dans les feuilles via l'incubation des racines de plantes entières. Néanmoins, quelques investigations supplémentaires seront nécessaires pour valider cette méthode.

# Bibliographie

## Thèse :

Benard C, 2009. Etude de l'impact de la nutrition azotée et des conditions de culture sur le contenu en polyphénols chez la tomate. Thèse de doctorat INPL mention sciences agronomiques. Nancy.

## Ouvrages :

Benhamou N. (2009). La résistance chez les plantes – Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques. Paris, Editions tec et doc. ISBN : 2743011939.

Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux - Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Lausanne, Presses polytechniques et Universitaires Romandes. ISBN : 2880746256.

## Articles:

Anterola A.M., Jeon J.-H., Davin L.B., Lewis N.G., 2002. Transcriptional Control of Monolignol Biosynthesis in *Pinus taeda*. *Journal of Biological Chemistry*. 277(21): 18272 -18280.

Atkins C.A., Pate J.S., Peoples M.B., Joy K.W., 1983. Amino Acid Transport and Metabolism in Relation to the Nitrogen Economy of a Legume Leaf. *Plant Physiology*. 71(4): 841-848.

Benard C., Gautier H., Bourgaud F., Grasselly D., Navez B., Caris-Veyrat C., Weiss M. & Génard M., 2009. Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids, and phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(10): 4112-4123.

Bennett R.N. & Wallsgrove R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*. 127: 617-633.

Boatright J., Negre F., Chen X., Kish C.M., Wood B., Peel G., Orlova I., Gang D., Rhodes D., Dudareva N., 2004. Understanding in Vivo Benzenoid Metabolism in *Petunia* Petal Tissue. *Plant Physiology*. 135(4) : 1993 -2011.

Camacho-Cristóbal J. J., Anzellotti D., & González-Fontes A., 2002. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40(12): 997-1002.

Dixon R. A. & Paiva N. L., 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The plant cell*. 7(7): 1085-1097.

Fischer W.-N., Loo D.D.F., Koch W., Ludewig U., Boorer K.J., Tegeder M., Rentsch D., Wright E.M., Frommer W.B., 2002. Low and high affinity amino acid H<sup>+</sup>-cotransporters for cellular import of neutral and charged amino acids. *The Plant Journal*. 29(6): 717-731.

Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R., & Stitt M., 2006. Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. 46(4): 533-548.

Gautier H., Diakou-Verdin V., Bénard C., Reich M., Buret M., Bourgaud F., Poëssel JL., Caris-Veyrat C. & Génard M., 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance ? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (4): 1241-1250.

Heinzle E., Matsuda F., Miyagawa H., Wakasa K., & Nishioka T., 2007. Estimation of metabolic fluxes, expression levels and metabolite dynamics of a secondary metabolic pathway in potato using label pulse-feeding experiments combined with kinetic network modelling and simulation. *The Plant Journal*. 50(1): 176-187.

- Hirner A., Ladwig F., Stransky H., Okumoto S., Keinath M., Harms A., Frommer W.B., Koch W., 2006. Arabidopsis LHT1 Is a High-Affinity Transporter for Cellular Amino Acid Uptake in Both Root Epidermis and Leaf Mesophyll. *Plant Cell*. 18(8): 1931-1946.
- Le Bot J., Benard C., Robin C., Bourgaud F. & Adamowicz S., 2009. The ‘trade-off’ between synthesis of primary and secondary compounds in young tomato leaves is altered by nitrate nutrition: experimental evidence and model consistency. *Journal of Experimental Botany*. 60 (15): 4301-4314.
- Leser C., & Treutter D., 2005. Effects of nitrogen supply on growth, contents of phenolic compounds and pathogen (scab) resistance of apple trees. *Physiologia Plantarum*. 123(1): 49-56.
- Libourel I.G.L. & Shachar-Hill Y., 2008. Metabolic Flux Analysis in Plants: From Intelligent Design to Rational Engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59(1): 625-650.
- Liu X.Q., Chen H.Y., Ni Q.X., Lee Kyu S., 2008. Evaluation of the Role of Mixed Amino Acids in Nitrate Uptake and Assimilation in Leafy Radish by Using <sup>15</sup>N-Labeled Nitrate. *Agricultural Sciences in China*. 7(10): 1196-1202.
- Løvdaal T., Lillo C., 2009. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Anal. Biochem.* 387: 238–242.
- Løvdaal T., Olsen K., Slimestad R., Verheul M., & Lillo C., 2010. Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*. 71(5-6): 605-613.
- Matsuda F., Morino K., Miyashita M., Miyagawa H., 2003. Metabolic Flux Analysis of the Phenylpropanoid Pathway in Wound-Healing Potato Tuber Tissue using Stable Isotope-Labeled Tracer and LC-MS Spectroscopy. *Plant and Cell Physiology*. 44(5) : 510 -517.
- Matsuda F., 2005. Metabolic Flux Analysis of the Phenylpropanoid Pathway in Elicitor-treated Potato Tuber Tissue. *Plant and Cell Physiology*. 46(3): 454-466.
- Mondolot L., La Fisca P., Buatois B., Talansier E., De Kochko A., Campa C., 2006. Evolution in Caffeoylquinic Acid Content and Histolocalization During *Coffea canephora* Leaf Development. *Annals of Botany*. 98(1) : 33 -40.
- Näsholm T., Kielland K., Ganeteg U., 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytologist*. 182(1): 31-48.
- Olsen K.M., Slimestad R., Lea U.S., Brede C., Løvdaal T., Ruoff P., Verheul M., Lillo C., 2009. Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant, Cell & Environment*. 32(3) : 286-299.
- Persson J., Näsholm T., 2002. Regulation of amino acid uptake in conifers by exogenous and endogenous nitrogen. *Planta*. 215(4): 639-644.
- Ratcliffe R.G., Shachar-Hill Y., 2006. Measuring multiple fluxes through plant metabolic networks. *The Plant Journal*. 45(4): 490-511.
- Romero I., Tikunov Y., Bovy A., 2011. Virus-induced gene silencing in detached tomatoes and biochemical effects of phytoene desaturase gene silencing. *J. Plant Physiol.* 168(10): 1129-1135.
- Stewart A. J., Chapman W., Jenkins G. I., Graham I., Martin T., & Crozier A., 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell and Environment*. 24(11): 1189-1197.
- Treutter D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 4(3): 147-157.
- Vogt T., 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant*. 3(1): 2-20.
- Wilkinson S., Corlett J.E., Oger L., Davies W.J., 1998. Effects of Xylem pH on Transpiration from Wild-Type and *flacca* Tomato Leaves. A Vital Role for Abscisic Acid in Preventing Excessive Water Loss Even from Well-Watered Plants. *Plant Physiol.* 117(2): 703-709.

## Résumé

Les analyses de flux métaboliques (AFM) nécessitent le marquage isotopique du précurseur de la voie métabolique étudiée. Dans le cadre de l'étude de la voie des polyphénols de la tomate sous l'influence de facteurs environnementaux, l'équipe dédiée du laboratoire agronomie et environnement avait besoin d'une méthode d'introduction de phénylalanine marquée au carbone 13 dans différents organes de plants de tomates (feuilles et racines). L'objectif de ce stage a été cette mise au point méthodologique. Pour cela, différentes modalités d'introduction de phénylalanine marquée ont été testées. Ces tests ont été accompagnés par des suivis de teneurs en différents métabolites marqués et non marqués de la voie (phénylalanine, acide chlorogénique, rutine et kaempférol-rutinoside). Les taux d'enrichissement de ces composés ont été calculés. Des suivis de la physiologie de la plante ont également été réalisés ; ainsi que des mesures de l'expression de certains gènes clés impliqués dans la voie. L'ensemble de ces données permet de discuter l'intérêt des différentes modalités évaluées. Des résultats satisfaisants pour les racines ont été obtenus en cultivant en hydroponie des plantes entières avec une solution nutritive contenant le précurseur marqué. Les résultats pour les feuilles sont mitigés mais il semble que cette méthode puisse également marquer correctement les tissus foliaires.

Mots-clés : *Solanum lycopersicum*, phénylpropanoïdes, flavonoïdes, enrichissement isotopique, LC-MS, expression de gène