

Métabolisme spécialisé des plantes sous contraintes biotiques et abiotiques : le comprendre, le moduler, l'utiliser

Romain Larbat

▶ **To cite this version:**

Romain Larbat. Métabolisme spécialisé des plantes sous contraintes biotiques et abiotiques : le comprendre, le moduler, l'utiliser. Biologie végétale. Université de Lorraine, 2020. tel-03015000

HAL Id: tel-03015000
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03015000

Submitted on 19 Nov 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.

Université de Lorraine

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire Agronomie et Environnement

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme

d'Habilitation à Diriger des Recherches

par

Romain Larbat

Métabolisme spécialisé des plantes sous contraintes biotiques et abiotiques: le comprendre, le moduler, l'utiliser

Soutenance prévue à 14h le 2 mars 2020 à Vandoeuvre-lès-Nancy devant le jury composé de :

Marielle Adrian, Professeure Université de Bourgogne, Rapportrice

Nathalie Guivarc'h, Professeure Université de Tours, Rapportrice

Philippe Hugueney, Directeur de Recherche INRA, Rapporteur

Julie Chong, Professeure Université de Haute-Alsace, Examinatrice

Alain Hehn, Professeur Université de Lorraine, Examinateur

Christophe Robin, Directeur de Recherche INRA, Examinateur

Table des matières

Remerciements……6

Glossaire……7

Liste des figures……9

Liste des tableaux……11

1 Introduction générale 13

1.1 Contexte et objectifs 13

1.2 Cadre des travaux et structure du document 15

2 Synthèse des activités de recherche et d'encadrement 16

2.1 *Curriculum Vitae* 16

2.2 Titres universitaires 16

2.3 Expérience professionnelle 16

2.4 Compétences 17

2.5 Encadrement et activités pédagogiques 18

2.5.1 Enseignement 18

2.5.2 Encadrement d'étudiants 18

2.6 Rayonnement scientifique 20

2.6.1 Collaborations scientifiques majeures au cours de ma carrière 20

2.6.2 Projets Scientifiques 20

2.7 Contribution au fonctionnement du collectif de recherche 22

2.7.1 Mandats et responsabilités collectives 22

2.7.2 Expertises 22

2.7.3 Informations scientifiques destinées à un large public 22

2.8 Valorisation de travaux scientifiques 22

2.8.1 Résumé de la production scientifique 22

2.8.2 Articles dans revues internationales à comité de lecture 23

2.8.3 Chapitres d'ouvrages 25

2.8.4 Communications orales ou par voie d'affiche 26

3 Caractérisation de la voie de biosynthèse des furocoumarines 30

3.1 Quelques mots sur les composés phénoliques 30

3.1.1 Définition 30

3.1.1 Biosynthèse des composés phénoliques 30

3.2 Elucidation de la voie des furocoumarines 33

3.2.1 Présentation des furocoumarines 33

Une voie unique, des modèles multiples 35
3.2.2 CYP71AJ1, premier gène de P450 codant une psoralène synthase 35
3.2.3 La famille de P450 CYP71AJ est impliquée dans la synthèse des furocoumarines linéaires et angulaires chez les Apiacées 37
3.2.4 2009-2015 : des avancées majeures pour l'équipe MII 40
3.2.5 A la recherche de la Marmésine synthase 41
3.3 Conclusion 45
4 Etude de la régulation du métabolisme spécialisé des plantes par leur environnement biotique et abiotique 48
4.1 Introduction 48
4.1.1 La vie d'une plante, une question de compromis 48
4.1.2 Le compromis croissance/défense 48
4.1.3 La GDBH, un cadre conceptuel pour étudier l'impact de la disponibilité en ressources sur l'équilibre croissance défense. 50
4.1.4 L'étude de l'équilibre croissance défense dans un contexte agronomique : la tomate, un modèle idéal 51
4.2 La nutrition azotée comme modulateur de l'équilibre croissance/défense chez la tomate 52
4.2.1 Etude fine du levier nutrition azotée : Variabilité génétique, réponses à l'échelle de organe et de la voie métabolique 52
4.2.2 Conceptualisation du levier nutrition azotée : premiers pas vers un modèle de régulation par l'azote de la répartition des flux carbonés entre les métabolismes primaires et spécialisés 56
4.2.3 Effet de courtes limitations azotées : un moyen de découpler croissance et défense ? 61
4.3 Interactions Tomate x nutrition azotée x *Tuta absoluta* 63
4.3.1 Impact de la nutrition azotée du plant de tomate sur le développement de *Tuta absoluta* 64
4.3.2 L'effet « bottom up » de la fertilisation azotée sur le développement de *Tuta absoluta* est médié par une composante nutritive 65
4.3.3 Caractérisation des mécanismes de défense mis en place en réponse à l'herbivorie de *Tuta absoluta* et modulation par la disponibilité en azote 67
4.4 Conclusions 73
5 Perspectives de recherche 78
5.1 Description de voie de biosynthèse de métabolites spécialisés 79
5.1.1 Furocoumarines 79
5.1.2 Phénolamides 80
5.2 Fonction physiologique des phénolamides 82
5.3 Etude du compromis croissance défense chez les plantes 83

5.3.1 Modélisation mécaniste de l'acquisition et de la répartition des ressources entre croissance et défense 84
5.3.2 Modulation de voies métaboliques et effets sur le fonctionnement de la plante..... 85
5.4 Etude spécifique des mécanismes de résistance de la tomate à *T. absoluta* en vue du développement de solutions de biocontrôle 85
5.4.1 Etude des défenses endogènes de la plante et de leur stimulation par le priming et la disponibilité en azote 86
5.4.2 Importance de la génétique dans la résistance à *Tuta absoluta* et la réponse à des leviers agronomique de biocontrôle. 87
5.5 Evaluation des activités thérapeutiques de métabolites spécialisés de plantes 87
6 Conclusions..... 89
7 Bibliographie..... 90

Remerciements

Mes tous premiers remerciements s'adressent à Christophe Robin, mon parrain dans cette aventure, mais avant tout mon partenaire sur la thématique « écophysiologie de la plante agressée » (trop souvent résumée à « l'équipe Tomate », Grr…) que nous avons développé depuis 2007. Merci pour tous tes conseils, ton sens de l'éthique si précieux en Sciences, et tout ton temps consacré à me former à l'écophysiologie, à l'encadrement et à la prise de responsabilité.

Un grand merci à Alain Hehn. Toujours disponible, toujours positif, toujours prêt à repousser les limites et se ré-inventer. C'est un plaisir de t'accompagner de nouveau dans la passionnante aventure des furocoumarines.

Comment ne pas remercier Frédéric Bourgaud, directeur de ma thèse dont une partie des travaux est présentée ici. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir accompagné dans les premières étapes de ma carrière.

Je suis particulièrement reconnaissant à Marielle Adrian, Nahalie Guivarc'h, Julie Chong et Philippe Hugueney d'avoir accepté si promptement d'expertiser ce document et de siéger dans mon jury. Merci à vous !

Un merci tout spécial à tous les doctorants et stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer. Les docteurs Mathilde Royer, Victoire Coqueret, Gianni Galati, Peng Han, les doctorantes Cloé Villard, Marwa Roumani, Simona Tortorici, les stagiaires Cuong Nguyen, Terence Courbariaux, Vincent Sauveplane, Nicolas Gripon, Christelle Hoeffler, Thaïs Génard, Imane Mechai, Alizée Schahl, Clémentine Marie, Hadjara Saindoux, Krissie Loisy, Laura Vimenet.

Les travaux présentés ici sont le fruit d'interactions constructives multiples, scientifiques et humaines. C'est aussi le fruit d'un travail effectué dans un environnement agréable et stimulant. Merci donc à tous les collaborateurs des différents projets, mais aussi toutes les personnes que je côtoie au quotidien dans les locaux de l'ENSAIA et du LAE. A tous, Merci, Thank you, Takk, Danke, Arigato, Xièxiè, Dankjewel, Gracie, Shukraan.

Sortons du cadre professionnel pour saluer et remercier ici tout mes amis et ma famille. Merci à mes parents pour leur soutien et leur attention indéfectibles. Enfin, merci Pauline, Célestine et Marceau pour le bonheur vécu au quotidien à vos côtés.

Glossaire

Instituts/Universités

CNR	Consiglio Nazionale delle Riserche	Italie
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique	France
ENSAIA	Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires	Nancy
FREDON	Fédération Régionale de Défense contre les Organismes Nuisibles	Grand-Est
INRA	Intitut National de la Recherche Agronomique	France
LIST	Luxembourg Institute of Science and Technology	Luxembourg
IBMP	Institut de Biologie Moléculaire des Plantes	France
ISA	Institut de Sophia AgroBiotech	Sophia-Antipolis
UL	Université de Lorraine	Grand-Est

Structures de Recherche

A2F	Pôle de recherche Agronomie, Agroalimentaire, Forêt	Lorraine
EA	Département Environnement et Agronomie de l'INRA	France
EFABA	Structure fédérative de recherche Ecosystèmes Forestiers Agroressources, Bioprocédés et Alimentation	Lorraine
LUE	Lorraine Université d'Exellence	Lorraine
SMACH	Metaprogramme INRA Sustainable MAnagement of Crop Health	France
UMR	Unité Mixte de Recherche	
UR	Unité de Recherche	

Equipes/Unités de recherche

AGISEM	Equipe AGriculture bIodiversité Services écosystémiques et Evaluation Multicritère	Nancy-Colmar
BFP	Biologie du Fruit et Pathologie	Bordeaux
GAFL	Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes	Avignon
L2CM	Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire	Nancy
LAE	Laboratoire Agronomie et Environnement	Nancy-Colmar
LIBio	Laboratoire d'Ingénierie des BIOmolécules	Nancy
MII	Equipe métabolisme secondaire	Nancy
PSH	Plantes et Systèmes Horticoles	Avignon
PV	Pathologie Végétale	Avignon
SIMPA	Stress, IMmunité, PAthogènes	Nancy
WPR	Wageningen Plant Research	Pays-Bas

Commissions

CS	Conseil Scientifique
CSS	Commission scientifique spécialisée
EGBIP	Ecophysiologie Génétique et Biologie Intégrative des Plantes

Grades

DR	Directeur de recherche
CR(CN)	Chargé de Recherche (Classe Normale)
IR	Ingénieur de Recherche
IE	Ingénieur d'Etude
TR	Technicien de Recherche
ATER	Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche

Diplômes

BTS	Brevet de Technicien Supérieur
DEUG	Diplôme d'Etudes Universitaires Générales
DEA	Diplôme d'Etudes Approfondies
HDR	Habilitation à Diriger des Recherches

Financements

AAP	Appel A Projets	
ANR	Agence Nationale de la Recherche	France
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	Allemagne
ERA-NET	European Research Area NETwork	Europe
PHC	Programme Hubert Curien	France
SusFood	ERA-NET Sustainable Food	Europe
SusCrop	ERA-NET Sustainable Crop production	Europe

Termes scientifiques

ADN	Acide DésoxyiboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
COV	Composé Organique Volatil
CYP	Cytochrome P450
GC	Gaz Chromatography
KO	Knock Out
LC	Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
MT180	Ma Thèse en 180 secondes
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
P-UVA	Psoralène-UVA therapy
QTL	Quantitative Trait Loci
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
UV	Ultra-Violet

Liste des figures

Figure 1 : Positionnement des questions-clés sur l'étude du métabolisme spécialisé des plantes autour desquelles se structurent mes recherches. 14
Figure 2 : Représentation schématique des voies de biosynthèse du shikimate et des phénylpropanoïdes. 32
Figure 3 : Schéma de la voie de biosynthèse des furocoumarines linéaires et angulaires. 34
Figure 4 : Profil d'expression du gène CYP71AJ1 et d'accumulation de psoralène dans les cellules en culture d'Ammi majus élicitées par l'ajout d'extraits de Phytophtora sojae. 36
Figure 5 : Identification de l'activité psoralène synthase de CYP71AJ1. 37
Figure 6 : Simulation d'ancrage de la (+)-marmésine (A) et de la columbianétine (B) dans le site active d'un modèle tridimensionnel de CYP71AJ1**.** 38
Figure 7 : Caractérisation fonctionnelle de CYP71AJ4 en présence de (+)-columbianétine. 39
Figure 8 : Schéma récapitulatif des stratégies de recherche de gènes candidats codant l'activité marmésine synthase chez le panais et le figuier par une approche de transcriptomique. 43
Figure 9 : Représentation schématique des deux clusters de gènes impliqués dans la voie des furocoumarines chez le panais. 44
Figure 10 : Diagramme conceptuel de la détermination de la fitness d'une plante médiée par l'effet combiné de la disponibilité en ressources aux processus de défense, croissance et reproduction, de leur compromis et des interactions écologiques. 48
Figure 11 : Représentation schématique de la théorie de la balance croissance défense. Le Bot et al. (2009). 50
Figure 12 : Répartition de la biomasse sèche des 9 cultivars de tomate sous fertilisation HN et LN... 53
Figure 13 : Répartition de la biomasse sèche et de l'accumulation d'acide chlorogénique (CGA) par organe pour les 9 cultivars de tomate sous fertilisation HN et LN. 54
Figure 14 : Répartition de la concentration en composés phénoliques dans les feuilles (a), tiges (b) et racines (c) du plant de tomate sous fertilisation HN et LN. 55
Figure 15 : Représentation schématique du modèle de répartition du carbone entre les voies du métabolisme primaire et secondaire dans la plante en fonction de la disponibilité en nitrate, basé sur le maintien de l'homéostasie du saccharose. 57
Figure 16 : Prédiction du modèle sur 72h avec une alternance jour/nuit (12h/12h) en condition de disponibilité sous HN (A, B, C) ou LN (D, E, F). 58
Figure 17 : Exemple d'un réseau de signalisation associé à l'équilibre croissance-défense et conséquence phénotypique de sa modulation. 60
Figure 18 : Résumé des principaux résultats de l'expérimentation portant sur de courtes limitations en azote. 62
Figure 19 : Proportion des œufs de *Tuta absoluta* atteignant les stades larve, pupe et adulte après dépôt sur des plants HN et LN (n = 24). 64
Figure 20 : Impact de la nutrition azotée du plant de tomate sur des traits de développement de Tuta absoluta. 64
Figure 21 : Aire des galeries et des déjections générées par les larves de *Tuta absoluta*. 66
Figure 22: Estimation de la consommation en matière sèche (A), eau (B) et azote (C) par les larves de Tuta absoluta se nourrissant sur tissus HN ou LN. 66
Figure 23 : Influence de la charge en larves sur l'induction des activités enzymatiques polyphénol oxydase (PPO) et péroxydase (POD) dans les différents organes du plant de tomate soumis à l'herbivore de larves de Tuta absoluta déposées sur une feuille. 68

Figure 24 : Logistique expérimentale pour le piégeage de COV. 69
Figure 25 : Réponse métabolique du plant de tomate induite par l'herbivorie de Tuta absoluta**.** 71
Figure 26 : Concentration en composés phénoliques dans les différents étages foliaires du plant de tomate infesté par des larves de Tuta absoluta pendant 7 jours. 72
Figure 27 : Concentration en tomatine dans les différents étages foliaires et les racines du plant de tomate infesté par des larves de Tuta absoluta pendant 7 jours**.** 73
Figure 28 : Evolution et connexions de mes thématiques de recherche depuis 2007 et perspectives**.** 79
Figure 29 : Profil d'expression de SlPHT1-4 dans le plant de tomate. 82
Figure 30 : Contributions, création et utilisation d'un modèle de répartition du carbone entre croissance et défense à l'échelle de la plante. 84

Liste des tableaux

Tableau 1 : Organisation chronologique et thématique des thèses co-dirigées (en vert) et des projets de recherches passés, présents et futurs (en bleu) sur la période 2006 – 2021, intégrant mes postes avant recrutement à l'INRA (en orange). 15
Tableau 2 : Résumé des thèses co-dirigées. 18
Tableau 3 : Résumé des stages de M2 dirigés et co-dirigés..... 19
Tableau 4 : Répartition des publications en fonction des années. 22
Tableau 5 : Principales sous-familles de composés phénoliques et rôles écophysiologiques associés**.** 31
Tableau 6 : Diversité et spécificité des substrats catalysés par SlPHT1-4. 81

1 Introduction générale

1.1 Contexte et objectifs

Les premières plantes terrestres seraient apparues il y a 450 millions d'années (Steemans et al., 2009). L'évolution de ces organismes est contrainte par deux caractères majeurs : L'autotrophie, ou la capacité à créer de la matière organique à partir de l'énergie lumineuse et de ressources minérales, qui fait des plantes le premier maillon de la chaine alimentaire, et la sessilité, ou immobilité, qui oblige les plantes à s'adapter aux contraintes environnementales et biotiques de leur milieu. Cette adaptation repose sur des évolutions morphologiques, comme la lignification des tissus, favorisant le port érigé tout en conférant une résistance accrue aux agresseurs, le développement de structures de protection comme les épines, ou l'épaississement des feuilles réduisant les pertes en eau des plantes poussant dans les régions arides. A ces évolutions morphologiques s'ajoutent des évolutions d'ordre chimique. Ainsi, les plantes ont acquis la capacité de synthétiser une grande diversité de molécules dont les multiples fonctions leur permettent d'interagir avec leur milieu. Ces molécules, ont d'abord été dénommées métabolites secondaires, en référence à leur faible concentration dans les tissus et leur rôle supposé mineur, en comparaison des métabolites primaires (sucres, lipides, peptides et protéines) communs à tous les organismes vivants. Depuis quelques années, cette dénomination est, petit à petit, remplacée par le terme métabolites spécialisés, en référence à leur distribution très spécifique au sein du règne végétal et leurs fonctions multiples et essentielles à la plante, comme par exemple, l'attraction visuelle et olfactive des insectes pollinisateurs, la protection contre les herbivores et pathogènes ou bien encore, la protection contre les UV.

L'étude du métabolisme spécialisé des plantes a longtemps été négligée alors que paradoxalement (i) ce métabolisme est à l'origine d'une partie importante de la diversité chimique du vivant dont l'Homme peut tirer profit en particulier dans la recherche de médicaments, et (ii) il constitue le moyen d'interaction majeur de la plante avec son environnement. Or, une meilleure connaissance des interactions plante/environnement est essentielle dans l'optique de développer des pratiques agricoles plus économes en intrants chimiques.

Outre la caractérisation de la diversité chimique des extraits végétaux, l'étude du métabolisme spécialisé peut se décliner sous plusieurs questions (Fig. 1):

1- *Comment sont synthétisés ces métabolites ?* La diversité moléculaire des métabolites spécialisés repose sur des voies de biosynthèses multiples, complexes et pour certaines encore largement méconnues. La caractérisation des voies de biosynthèses passe par l'identification des acteurs de ces voies : enzymes et, par extension, gènes-clés associés.

2- *Comment sont régulées les voies de biosynthèse menant à l'accumulation en métabolites ?* L'accumulation des métabolites spécialisés est soumise à une régulation spatiale et temporelle très fine ; certains d'entre eux ne sont produits que lorsque c'est nécessaire pour la plante, à un stade phénologique particulier ou en réponse à un stimulus (attaque de pathogène, stress environnemental). Comprendre ces mécanismes de régulation permet ainsi d'envisager de mieux contrôler l'accumulation en métabolites d'intérêt.

3- *Quels sont les rôles physiologiques des métabolites spécialisés ?* Comme nous le verrons par la suite, un certain nombre de fonctions physiologiques leur ont été attribuées. C'est le

cas des isoflavonoïdes produites par les racines des Fabacées et qui interviennent dans l'établissement de symbioses avec les bactéries du genre *Rhizobium*, ou bien d'alcaloïdes comme la nicotine, produite par le tabac et qui joue un rôle protecteur contre les ravageurs. Cependant, la diversité des rôles physiologiques des métabolites spécialisés reste encore très peu connue au regard de leur diversité structurale.

4- *Quel coût, en ressources et en énergie, représente la biosynthèse de métabolites spécialisés pour la plante ?* Leur synthèse mobilise les mêmes ressources (carbone, élément minéraux) que celles dont la plante a besoin pour sa croissance. Plusieurs travaux font en effet état d'un antagonisme entre la mise en place de défense chez la plante, essentiellement basée sur le métabolisme spécialisé et sa croissance qui repose plutôt sur le métabolisme primaire. On parle ainsi de compromis entre croissance et défense. La compréhension des déterminismes de cet équilibre est essentielle dans l'optique de développer des modes de cultures plus résilients et tout aussi productifs.

5- *Comment tirer bénéfice des connaissances acquises par l'étude du métabolisme spécialisé ?* Les métabolites spécialisés, de par leur diversité structurale et la variété d'activités biologiques associées, constituent une réserve quasi-inépuisable de molécules d'intérêt dans différents secteurs économiques. Encore faut-il les caractériser ! Par ailleurs l'ensemble des connaissances académiques sur le métabolisme spécialisé doit permettre de mieux comprendre l'interaction de la plante avec son environnement. Comment utiliser concrètement ces connaissances pour améliorer nos systèmes de production ?

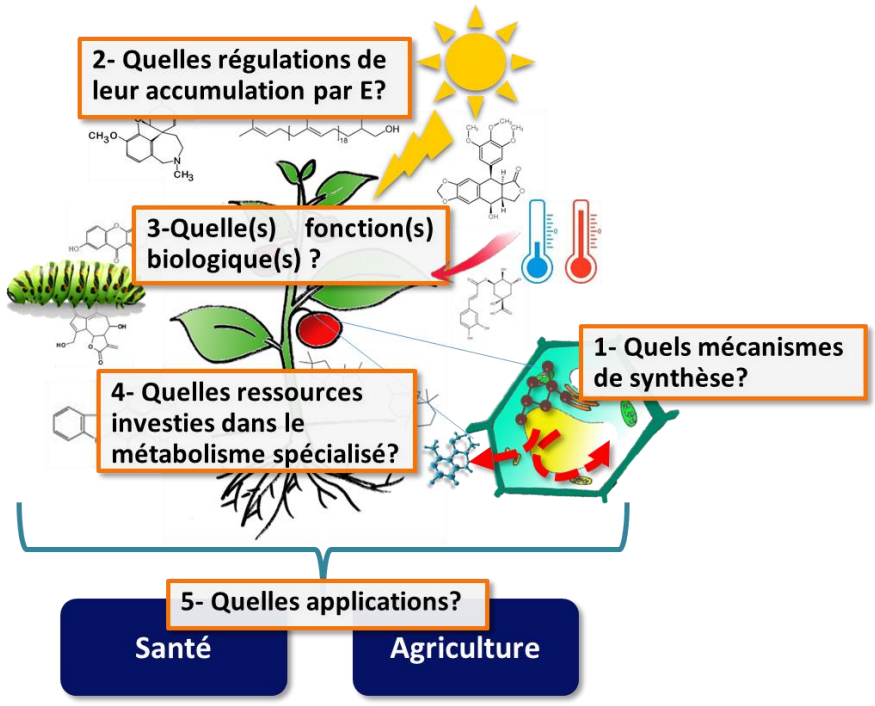


Figure 1 : Positionnement des questions-clés sur l'étude du métabolisme spécialisé des plantes autour desquelles se structurent mes recherches.

1.2 Cadre des travaux et structure du document

Depuis ma thèse initiée en 2002 et mon recrutement à l'INRA en tant que chargé de recherche en 2007, j'ai porté mon attention à l'étude du métabolisme spécialisé des plantes. Mes activités de recherches, illustrées en figure 1, ont pendant longtemps eu pour objectif de répondre à deux questions qui sont (1) la description et la compréhension des voies de biosynthèse de métabolites de la famille des composés phénoliques et (2) la compréhension de la régulation de l'accumulation de ces métabolites par l'environnement de la plante. Dans ce dernier cas, mon objet d'étude est le plant de tomate, soumis à des contraintes abiotiques (limitation de la fertilisation en azote) et biotiques (herbivorie). Depuis quelques années mes travaux intègrent trois autres questionnements qui sont (3) l'étude de la fonction de métabolites spécialisés dans la plante, (4) l'étude du coût de leur biosynthèse et (5) la valorisation de ce métabolisme au travers du criblage d'activité biologique de nouveaux métabolites spécialisés et de l'évaluation de pratiques culturales visant à stimuler les défenses naturelles des plantes dans la perspective d'une agriculture sans pesticides. D'un point de vue opérationnel, mon activité de recherche s'est réalisée au travers du portage et de la participation à divers projets de recherche, ainsi qu'à la co-direction de 5 thèses (Tableaux 1 et 2).

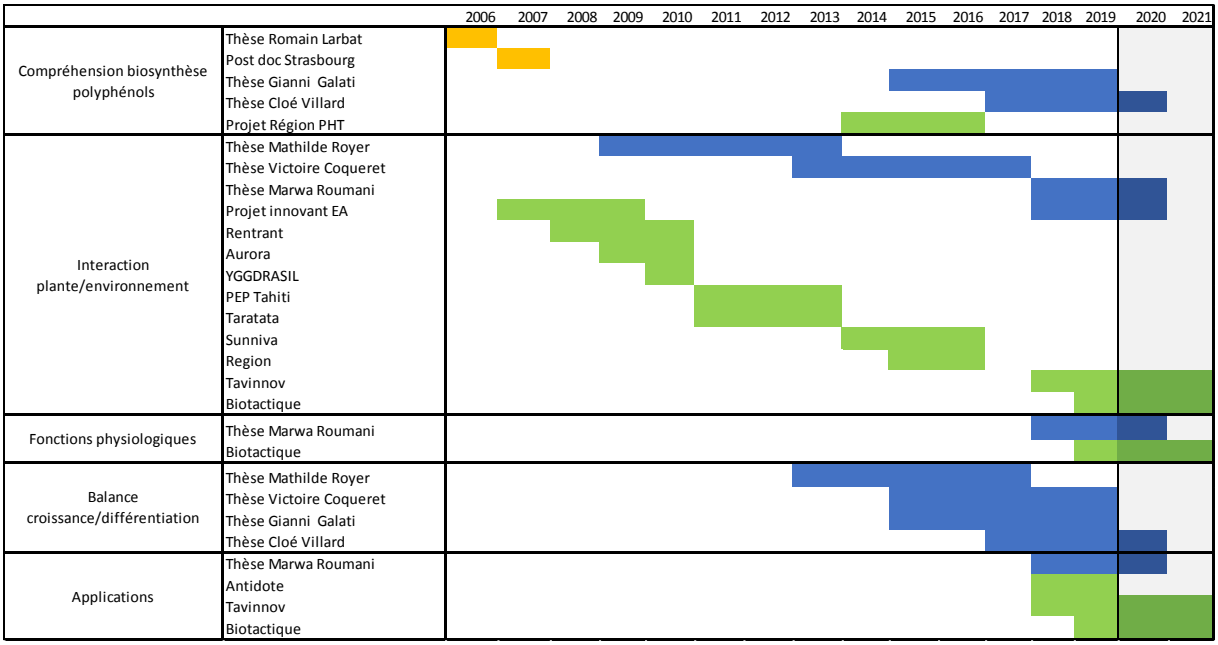


Tableau 1 : Organisation chronologique et thématique des thèses co-dirigées (en vert) et des projets de recherches passés, présents et futurs (en bleu) sur la période 2006 – 2021, intégrant mes postes avant recrutement à l'INRA (en orange).

Le mémoire que je présente pour l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches est constitué de 4 parties. La première présente une synthèse factuelle de mes activités de recherche et d'encadrement. Le détail de mon activité de recherche est ensuite décrit dans la 2ème et 3ème parties qui porteront respectivement sur la caractérisation de la voie de biosynthèse de polyphénols et l'étude de la régulation de l'accumulation de métabolites spécialisés chez la tomate en réponse à des contraintes biotiques et abiotiques. Chaque partie débutera par une petite introduction pour resituer le contexte des travaux. La 4ème partie présentera les projets amorcés et les perspectives envisagées autour des questions du coût métabolique de la synthèse de ces molécules et de leur valorisation dans les secteurs de la santé et de l'agriculture.

2 Synthèse des activités de recherche et d'encadrement

2.1 *Curriculum Vitae*

Romain Larbat
Né le 10 mai 1979 à Rochefort (17)
Pacsé, 2 enfants
Tel. : 0661555307

Adresse personnelle
84 rue Félix Faure, 54000 Nancy

Adresse professionnelle
ENSAIA, Laboratoire Agronomie et Environnement
2, avenue de la forêt de Haye, BP 20163,
54505 Vandoeuvre Cedex

Téléphone professionnel : 0372744061
romain.larbat@univ-lorraine.fr

2.2 Titres universitaires

2006 Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Mention « Sciences agronomiques »
Titre : Contribution à l'étude des P450 impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines

Directeur de thèse : Pr. Frédéric Bourgaud
Co-directeur : Pr. Eric Gontier

2002 DEA de l'université de Bordeaux 2
Spécialité « Biologie Santé »

2001 Maîtrise de l'université de Bordeaux 2
Mention « Biologie cellulaire et physiologie »
Spécialité « Biotechnologie et régulations physiologiques du développement des plantes »

2000 Licence « Biologie cellulaire et physiologie » de l'université de Poitiers

1999 DEUG « Sciences de la vie » de l'université de Poitiers

1997 Baccalauréat Série S (Lycée Merleau-Ponty de Rochefort)

2.3 Expérience professionnelle

Depuis Septembre 2007 : Chargé de recherche INRA (CRCN) au laboratoire Agronomie et Environnement de l'ENSAIA.
Sujet : Etude du métabolisme spécialisé des plantes et de sa régulation par l'environnement dans une perspective de protection des cultures

Janvier-Aout 2010 : Mission de longue durée à l'Université de Stavanger sous la direction du Pr. C. Lillo. Financé par le programme d'accueil du ministère norvégien de la recherche Yggdrasil.
Sujet de la mission : Etude de l'effet de limitations ponctuelles et répétées de la nutrition azotée sur la croissance et le métabolisme des polyphénols chez la tomate.

Octobre 2006 à Septembre 2007 : Chercheur post-doctorant dans l'équipe du Dr. Werck-Reichhart au département « Réponse métabolique à l'environnement biotique » de l'IBMP de Strasbourg.
Sujet : Caractérisation de cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme d'herbicides chez le blé, le riz et Arabidopsis : criblage fonctionnel et approches de protéomique

Juin à Septembre 2006 : Chercheur post-doctorant dans l'équipe du Pr. Bourgaud au laboratoire Agronomie et Environnement de l'ENSAIA
Sujet : Clonage et caractérisation de cytochromes P450 de la voie des furocoumarines angulaires chez le céleri et le panais

Octobre 2002 à Mai 2006 : Thèse de doctorat mention « Sciences Agronomiques » dans l'équipe du Pr. Bourgaud au laboratoire Agronomie et Environnement de l'ENSAIA
Sujet : Contribution à l'étude des cytochromes P450 impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines

Septembre 2001 à juin 2002 : Stagiaire de DEA sous la direction du Dr. Brouquisse dans l'unité de physiologie végétale de Bordeaux (UMR INRA 619)
Sujet : Étude *in vitro* de l'interaction d'hexokinases recombinantes avec des mitochondries végétales

Mai-juin 2001 : Stagiaire de maîtrise durant 6 semaines sous la direction du Dr. Hernoult dans l'unité de physiologie végétale de Bordeaux (UMR INRA 619)
Sujet : Étude du profil de méthylation du gène *Superman* chez une lignée de tabac alloplasmique Nta(rep)S

Juillet-aout 2000 : Stagiaire sous la direction du Dr. Béguier dans l'unité de génétique et amélioration des plantes fourragères de l'INRA de Lusignan
Sujet : Étude des caractères phénotypiques liés au rendement chez le ray-grass anglais (*Lolium perenne*)

2.4 Compétences

Ecophysiologie : Analyses de croissance, métabolisme primaire et secondaire
Biologie moléculaire : Extraction d'ADN végétal et microbien ; PCR ; clonage ; mutagenèse dirigée ; construction et criblage de banque d'ADNc ; transformation de plantes et microorganismes
Biochimie : Expression hétérologue de protéines recombinantes ; enzymologie ; purification d'organites ; techniques de protéomique
Techniques analytiques : LC ; GC ; Spectrométrie de masse
Bio-informatique : Analyse de données « omics » (Galaxy, Genomatix, Cytoscape), statistiques (R).

2.5 Encadrement et activités pédagogiques

2.5.1 Enseignement

Mon activité d'enseignement se limite à une intervention annuelle de 2h, portant sur la métabolomique, donnée aux étudiants en 3ème année d'école nationale supérieure en sciences agronomiques et industries agro-alimentaires (ENSAIA-UL)

2.5.2 Encadrement d'étudiants

Depuis mon début de carrière j'ai eu le plaisir de co-diriger 5 thèses, dont 2 en cours. Les détails de chacune de ces thèses sont donnés dans le tableau 2. A cela s'ajoute la direction ou le co-direction de 8 stages de master 2 (Tableau 3) et de divers autres stages de courte durée (M1, L3, BTS, stages TIPE de classes prépa, 1ere année d'école d'ingénieur).

Par ailleurs, j'ai été le co-encadrant de 6 doctorants étrangers accueillis en stage au laboratoire dans le cadre de collaborations avec les universités de Tunis, Tlemcen, Bejaia et Catane. Ces différents stages, qui ont eu lieu entre 2009 et 2019, avaient des durées de 1 à 5 mois.

Date	Co-directions de thèse	Devenir du doctorant
2009-2013	**Mathilde Royer** Etude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs. (Bourse INRA-Région Lorraine) Direction : Dr. Christophe Robin, Dr. Romain Larbat (50%)	Responsable inspections à la FREDON Lorraine (Fédération Régional de Défense contre les Organismes Nuisibles)
2013-2017	**Victoire Coqueret** Fonctionnement de la plante agressée : détermination des coûts et bénéfices de la défense de la tomate vis-à-vis de *Tuta absoluta.* (Bourse INRA-Région Lorraine) Direction : Dr. Christophe Robin, Dr. Romain Larbat (50%)	Ingénieur dans la société Capgemini
2015-2019	**Gianni Galati** Edition de la voie de synthèse des furocoumarines : approches d'ingénierie métabolique pour générer des mutants surproduteurs de furocoumarines et analyse des conséquences de la synthèse de ces molécules sur la physiologie de ces plantes. (Bourse MENRT) Direction : Pr. Alain Hehn, Dr. Romain Larbat (50%)	Enseignant chercheur contractuel (ATER) au LAE
2017-2020	**Cloé Villard** Etude du coût et des bénéfices de l'implémentation de la voie de biosynthèse des furocoumarines chez le tabac et la tomate. (Bourse MENRT) Direction : Pr. Alain Hehn, Dr. Romain Larbat (50%)	
2018-2021	**Marwa Roumani** Titre : Etudes des mécanismes de résistance de la tomate à la larve mineuse *Tuta absoluta.* (Bourse libanaise) Direction : Dr. Christophe Robin, Dr. Romain Larbat (50%)	

Tableau 2 : Résumé des thèses co-dirigées.

Date	Encadrement de Master 2
2003	**Cuong Nguyen** Caractérisation biochimique des mutants de la cinnamate-4-hydroxylase de *Ruta graveolens* généré par mutagenèse dirigée Encadrement : Pr. Frédéric Bourgaud (50%), Dr. Romain Larbat (50%)
2005	**Vincent Sauveplane** Recherche de résidus impliqués dans la résistance au psoralène chez la cinnamate-4-hydroxylase de *Ruta graveolens* Encadrement : Pr. Frédéric Bourgaud (50%), Dr. Romain Larbat (50%)
2011	**Nicolas Gripon** 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'étude de fluxomique sur la voie des composés phénoliques. Encadrement : Dr. Romain Larbat (100%)
2012	**Christelle Hoeffler** Mise au point d'un système de piégeage et d'identification de composés organiques volatils de feuilles de tomate Encadrement : Dr. Christophe Robin (75%), Dr. Romain Larbat (25%)
2012	**Thaïs Genard** Développement d'une méthode d'introduction de phénylalanine marquée au ^{13}C dans les feuilles de tomate en vue d'études de flux métaboliques de la voie de synthèse des polyphénols Encadrement : Dr. Romain Larbat (100%)
2013	**Imane Mechai** Fonctionnement de la plante agressée : Impact de l'attaque de *Tuta absoluta* sur les échanges gazeux foliaires, l'assimilation de l'azote et l'accumulation de composés de défense chez la tomate Encadrement : Dr. Christophe Robin (50%), Dr. Romain Larbat (50%)
2016	**Alizée Schahl** Croissance et développement de la tomate et composition des organes en phytomicronutriments et composés de défense : effets d'apports de matières organiques végétales dans le substrat de culture Encadrement : Dr. Romain Larbat (100%)
2019	**Clémentine Marie** Analyse métabolomique des interactions plantes/champignons : Cas des pathosystèmes Pommier/*Venturia inaequalis* et Peuplier/*Melampsora larici-populina* Encadrement : Dr. Romain Larbat (100%)
2020	**Hanane Jary** Analyse du rôle physiologique de métabolites spécialisés chez la tomate par une approche de génétique inverse Encadrement : Dr. Romain Larbat (50%) ; Marwa Roumani (50%)

Tableau 3 : Résumé des stages de M2 dirigés et co-dirigés.

2.6 Rayonnement scientifique

2.6.1 Collaborations scientifiques majeures au cours de ma carrière

Description de la voie de biosynthèse des furocoumarines

Université de Marburg (Allemagne). Pr. Matern (2005-2012)
Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (Strasbourg). Dr. Werck-Reichhart, Dr. Navrot (2005-présent)
Université de Kyoto. P. Kitajima (2015-présent)
Wageningen Plant Research (2019-présent)

Régulation du métabolisme spécialisé par l'environnement biotique et abiotique

Unité de recherche INRA Plante et Systèmes Horticoles : Dr. Le Bot et Dr. Adamowicz (2007-présent)
Université de Stavanger (Norvège). Pr. Lillo ; Pr. Ruoff (2008- présent)
Unité de recherche INRA Pathologie Végétale : Dr. Nicot (2011-présent)
Institut Sophia Agrobiotech : Dr. Desneux, Dr. Anne-Violette Lavoir (2011-présent)
Chinese Academy of Science: Dr. Han (2012-présent)
Max Planck Institute Jena: Dr. Unisicker et Pr. Gershenzon (2016-présent)
Université de Catane : Dr. Biondi (2017-présent)
Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire. Pr. Duval (2018-présent)

Projets annexes recourant à mes compétences en métabolomique

CNR Florence : Pr. Agati (2013-2016)
Université de Bejaia : Dr. Chougui (2009-2016)
Laboratoire de recherche en science végétale CNRS: Dr. Grima-Pettenati (2015-2018)
Laboratoire Interaction Arbre Microorganismes (Nancy). Dr. Halckett (2017-présent)

2.6.2 Projets Scientifiques

2007-2009 Partenaire d'un projet Innovant soutenu par le département Environnement et Agronomie de l'INRA : « Impact de la nutrition azotée, en interaction avec le statut carboné de la plante, sur la synthèse de composés à forte valeur santé chez la tomate » (30k€).

2008-2010 Porteur d'un projet Jeune Chercheur soutenu par la Région Lorraine : « Étude de la Régulation ENzymatique et TRANscriptionnelle de la voie de biosynthèse des polyphénols dans le plant de Tomate soumis à une limitation de la nutrition azotée »_ « Rentrant » (10k€)

2009-2010 Partenaire du projet Aurora soutenu par le partenariat Hubert Curien "Analysis and mathematical modelling of the polyphenolic pathway in response to low nitrogen nutrition in tomato". Ce projet subventionne les échanges de chercheurs entre mon laboratoire et le laboratoire Core de l'université de Stavanger. (3k€)

2010 Porteur d'un projet Yggdrasil soutenu par le ministère de la recherche de Norvège : « Impact of successive short starvations of nitrogen nutrition on plant

fitness and polyphenol metabolism of tomato ». Ce projet a subventionné un séjour de recherche de 6 mois à l'Université de Stavanger**.** (18k€)

2011-2014 Partenaire d'un projet soutenu dans le cadre du contrat Etat-Polynésie française : « Effets des pratiques agricoles sur la pression parasitaire dans les systèmes de production maraîchères : vers la fertilité durable des sols en Polynésie française ». (Total 290k€ ; 30k€ pour le LAE)

2012-2014 Partenaire d'un projet de Pari Scientifique soutenu par le département Environnement et Agronomie de l'INRA : « Trichomes, Azote et Résistance A *Tuta absoluta* chez la TomAte »_ « Taratata ». (30k€ ; 15k€ pour le LAE)

2013-2016 Partenaire du projet ERA-NET soutenu par l'Union Européenne : "Sustainable food production through quality optimized raw material production and processing technologies for premium quality vegetable products and generated by-products"_ "Sunniva". (1.5M€; 42k€ pour le LAE)

2014-2015 Porteur d'un Projet de recherche d'intérêt régional soutenu par la Région Lorraine: Etude de la voie de biosynthèse et du rôle physiologique de la caféoylputrescine chez la tomate_ « PHT ». (12k€)

2015-2016 Partenaire du projet de recherche d'intérêt régional : Identification des réactions de défense de la tomate à l'herbivorie par la larve mineuse *Tuta absoluta* par une étude de transcriptomique et analyses de composés organiques volatils. (10k€)

2016 Partenaire du projet de recherche soutenu par la Structure Fédérative de recherche EFABA : « Influences des caractéristiques de la litière et des vers de terre sur les activités de minéralisation de l'azote et du souffre par les micro-organismes du sol». (10k€)

2018-2020 Partenaire du projet soutenu par la Métaprogramme SMACH de l'INRA : Effets combinés de la résistance variétale, des stress azotés et mécaniques et des SDP sur la tavelure du pommier - Evaluation de la durabilité des stratégies alternatives à la lutte chimique_ « Tavinnov ». (70k€ ; 13k€ pour le LAE)

2018-2020 Porteur du projet soutenu par l'IDEX Lorraine Université d'excellence (LUE) :. Activité Thérapeutique de métabolites spécialisés impliqués dans l'interaction tomate-*Tuta absoluta*_ « AnTIdOTe » (20k€ ; 10k€ pour le LAE)

2018 Porteur du projet soumis à l'appel à projet ERA-NET Sustainable Crop : Plant Chemical defense in a tritrophic context. _ « PrEDAToR » *Non financé. Retenu en deuxième phase*

2019-2021 Porteur du projet inter-unité soutenu par le département Environnement et Agronomie de l'INRA : Biocontrôle de *Tuta absoluta* en culture de tomate : évaluation des pratiques de fertilisation azotée et de priming_ « BioTaCTiques ». (135k€ ; 45k€ pour le LAE)

2021-2027 Partenaire du projet PPR « cultiver protéger autrement » Cap Zéro Phyto. Adaptation du concept d'immunité écologique à la protection des cultures : Rosaceae et Solanaceae, deux études de cas. Projet en cours d'évaluation (3M€ ; 250k€ pour le LAE)

2.7 Contribution au fonctionnement du collectif de recherche

2.7.1 Mandats et responsabilités collectives

2018- Animateur de l'équipe « Métabolisme secondaire » de l'UMR 1121-1132

2018- Membre du Conseil de Direction de l'UMR 1121-1132

2016-2020 Membre élu du Conseil Scientifique du département EA de l'INRA

2016-2020 Membre de la Commission Scientifique Spécialisée (CSS) EGBIP de l'INRA

2010- Responsable des séminaires scientifiques de l'UMR 1121-1132

2009- Responsable métrologie de l'UMR 1121-1132

2.7.2 Expertises

- Membre du jury d'un concours de recrutement externe de CR INRA (2007)

- Evaluateur pour l'AAP ANR 2014 : 30 pré-projets en 1ère session

- Relecture d'articles à raison de 1-2/an (Frontiers in Plant Sciences, Rapid Communication in mass spectrometry, Food Chemistry…)

2.7.3 Informations scientifiques destinées à un large public

2019 Organisation et animation de la soirée Pint of Science sur le thème de la défense des plantes

2016 Participation à la journée Science sur la Place : Sensibilisation du grand public autour du thème sol et racines

2016 Participation de V. Coqueret à MT180

2016 Interview dans le journal Réussir Fruit et Légumes

2.8 Valorisation de travaux scientifiques

2.8.1 Résumé de la production scientifique

29 publications dans des revues internationales à comité de lecture

30 communications orales ou affichées dans des colloques nationaux ou internationaux

1 chapitre d'ouvrage

	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Publications	**1**	**0**	**2**	**1**	**0**	**1**	**1**	**0**	**3**	**2**	**2**	**2**	**5**	**4**	**2**	**3**
Comm. nationales	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	1	0	2	1
Comm. internationales	0	0	1	1	1	3	1	0	3	0	1	8	1	1	0	0

Tableau 4 : Répartition des publications en fonction des années.

2.8.2 Articles dans revues internationales à comité de lecture

2019

29) Han, P, Becker, C., Le Bot, J., **Larbat, R**., Lavoir, A.V., Desneux, N. (2019) Density- and trait-mediated indirect interactions in a "diamond" food web. *Journal of Ecology. In press*

28) Galati, G., Gandin, A., Jolivet, Y., **Larbat, R.** (auteur de correspondence)**,** Hehn, A. (2019) Untargeted metabolomics approach reveals diverse responses of *Pastinaca sativa* to ozone and wounding stresses. *Metabolites*, 9, 153. doi:10.3390/metabo9070153

27) Villard, C., **Larbat, R.,** Munakata, R., and Hehn, A. (2019). Defence mechanisms of Ficus: pyramiding strategies to cope with pests and pathogens. *Planta* 249: 617-633.

2018

26) Han, P., Desneux, N., Becker, C., **Larbat, R.,** Le Bot, J., Adamowicz, S., Zhang, J., and Lavoir, A.-V. (2018). Bottom-up effects of irrigation, fertilization and plant resistance on *Tuta absoluta*: implications for Integrated Pest Management. *J. Pest Sci*. 92: 1359-1370.

25) Maupetit, A., **Larbat, R.,** Pernaci, M., Andrieux, A., Guinet, C., Boutigny, A.L., Fabre, B., Frey, P., Halkett, F. (2018) Defense compounds rather than nutrient availability shape aggressiveness trait variation along a leaf maturity gradient in a biotrophic plant pathogen. *Frontiers in Plant Science* https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01396

2017

24) Kips, De Paepe, Van Meulebroek, Van Poucke, **Larbat**, Bernaert, Van Pamel, De Loose, Raes, Van Droogenbroeck (2017). A novel spiral-filter press for tomato juice processing: Fate of phenolic compounds, carotenoids and ascorbic acid content during spiral-filter processing, thermal downstream processing and storage. *Journal of Food Engineering*. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2017.06.010 http://prodinra.inra.fr/record/400630

23) Coqueret, V., Le Bot, J., **Larbat, R**., Desneux, N., Robin, C., Adamowicz, S. (2017). Nitrogen nutrition of tomato plant alters leafminer dietary intake dynamics. *Journal of Insect Physiology, 99*, 130-138. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2017.04.002 http://prodinra.inra.fr/record/390394

22) Soler, M., Plasencia, A., **Larbat, R.**, Pouzet, C., Jauneau, A., Rivas, S., Pesquet, E., Lapierre, C., Truchet, I., Grima-Pettenati, J. (2017). The *Eucalyptus* linker histone variant EgH1.3 cooperates with the transcription factor EgMYB1 to control wood formation. *New Phytologist* 213: 287-299 DOI: 10.1111/nph.14129

21) Nabet, N., Boudries, H., Chougui, N., Loupassaki, S., Souagui, S., Burló, F., Hernández, F., Carbonell-Barrachina, A.A., Madani, K., **Larbat, R**. (2017) Determination of biological activities and secondary compound composition from Crithmum maritimum aerial parts. *International Journal of Food Properties* DOI:10.1080/10942912.2016.1222541

2016

20) **Larbat, R**., Robin, C., Lillo, C., Drengstig, T., Ruoff, P. (2016). Modeling the diversion of primary carbon flux into secondary metabolism under variable nitrate and light/dark conditions. *Journal of Theorical Biology*, 402 : 144-157 DOI: 10.1016/j.jtbi.2016.05.008

19) Bouarroudj, K., Tamendjari, A., **Larbat, R.** (2016). Quality, composition and antioxidant activity of Algerian wild olive (*Olea europaea L. subsp. Oleaster*) oil. Industrial crops and products, 83: 484-491. DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.12.081

18) **Larbat, R.**, Adamowicz, S., Robin, C., Han, P., Desneux, N., Le Bot, J. (2016). Interrelated responses of tomato plants and the leaf miner *Tuta absoluta* to nitrogen supply. Plant Biology, 18, 495-504. DOI: 10.1111/plb.12425

17) Soler, M., Plasencia, A., Lepikson-Neto, J., Leal Oliveira Camargo, E., Dupas, A., Ladouce, N., Pesquet, E., Mounet, F., **Larbat, R.,** Grima-Pettenati, J. (2016) The woody-preferential gene EgMYB88 regulates the biosynthesis of phenylpropanoid-derived compounds in wood. *Frontiers in Plant Science* DOI: 10.3389/fpls.2016.01422

16) Royer, M., **Larbat, R.**, Le Bot, J., Adamowicz, S., Nicot, P.C., Robin C. (2016). Tomato response traits to pathogenic Pseudomonas species. Does nitrogen limitation matter? *Plant Science, 244, 57-67* DOI : 10.1016/j.plantsci.2015.12.008

2015

15) Chaouche, T. M., Haddouchi, F., Atik-Bekara, F., Ksouri, R., Azzi, R., Boucherit, Z., Tefiani, C., **Larbat, R.** (2015). Antioxidant, haemolytic activities and HPLC-DAD-ESI-MSn characterization of phenolic compounds from root bark of Juniperus oxycedrus subsp. Oxycedrus. *Industrial Crops and Products, 64*, 182-187. DOI : 10.1016/j.indcrop.2014.10.051

14) Chougui, N., Djerroud, N., Naraoui, F., Hadjal, S., Aliane, K., Zeroual, B., **Larbat, R**. (2015). Physicochemical properties and storage stability of margarine containing *Opuntia ficus-indica* peel extract as antioxidant. *Food Chemistry, 173*, 382-390. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.025

2014

13) Höfer, R., Boachon, B., Renault, H., Gavira, C., Miesch, L., Iglesias, J., Ginglinger, J. F., Allouche, L., Miesch, M., Grec, S., **Larbat, R.**, Werck-Reichhart, D. (2014). . Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from Arabidopsis thaliana in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant Physiology, 166* (3), 1149-1161. DOI : 10.1104/pp.114.244814

12) **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. DOI : 10.1016/j.plantsci.2014.04.010

2013

11) Royer, M., **Larbat, R.,** Le Bot, J., Adamowicz, S., Robin, C. (2013). . Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato?. *Phytochemistry, 88*, 25-33. DOI : 10.1016/j.phytochem.2012.12.003

10) Chougui, N., Tamendjari, A., Hamidj, W., Hallal, S., Barras, A., Richard, T., **Larbat, R**. (2013). Oil composition and characterisation of phenolic compounds of Opuntia ficus-indica seeds. *Food Chemistry, 139* (1-4), 796 - 803. DOI : 10.1016/j.foodchem.2013.01.054

2012

9) **Larbat, R**., Olsen, K. M., Slimestad, R., Lovdal, T., Benard, C., Verheul, M., Bourgaud, F., Robin, C., Lillo, C. (2012). . Influence of repeated short-term nitrogen limitations on leaf phenolics metabolism in tomato. *Phytochemistry, 77*, 119 - 128. DOI : 10.1016/j.phytochem.2012.02.004

8) **Larbat, R.,** Le Bot, J., Bourgaud, F., Robin, C., Adamowicz, S. (2012). . Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation. *Plant Biology, 14* (5), 760 - 769. DOI : 10.1111/j.1438-8677.2012.00564.x

7) Vialart, G., Hehn, A., Olry, A., Ito, K., Krieger, C., **Larbat, R**., Paris, C., Shimizu, B.-I., Sugimoto, Y., Mizutani, M., Bourgaud, F. (2012). . A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *Plant Journal, 70* (3), 460-470. DOI : 10.1111/j.1365-313X.2011.04879.x

2010

6) K.M . Olsen, A. Hehn, H. Jugdé, R. Slimestad, **R. Larbat**, F. Bourgaud et C. Lillo. (2010) Identification and characterisation of a flavonoid 3'-5' hydroxylase isolated from tomato. BMC Plant Biology 10:21 (IF 2010 : 4,085).

2009

5) **R. Larbat**, A. Hehn, J. Hans, S. Schneider, H. Jugdé, B. Schneider, U. Matern et F. Bourgaud. (2009) Isolation and functional characterization of CYP71AJ4 encoding the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis. JBC, 284: 4776-4785 (IF 2010 : 5,328).

2007

4) **R. Larbat,** S. Kellner, S. Specker, A. Hehn, E. Gontier, F. Bourgaud et U. Matern (2007) Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monoxygenase of furanocoumarin biosynthesis. JBC, 282 (1) : 542-554. (IF 2010 : 5,328).

2006

3) F. Bourgaud, A. Hehn, **R. Larbat,** S. Doerper, E. Gontier et U. Matern (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Phytochem. Rev. 5: 293-308. (IF 2010: 4,33).

2) C. Comino, S. Lanteri, E. Portis, A. Acquadro, A. Romani, A. Hehn, **R. Larbat** et F. Bourgaud. (2006) Isolation and functional characterization of a cDNA coding an hydroxy-cinnamoyltransferase involved in phenylpropanoid biosynthesis in *Cynara cardunculus* L. BMC Plant Biology 7 : 14 (IF 2010 : 4,08).

2004

1) A. Gravot, **R. Larbat**, A. Hehn, K. Lièvre, E. Gontier, J-L. Goergen et F. Bourgaud (2004). Cinnamic Acid 4-Hydroxylase Mechanism-Based Inactivation by Psoralen Derivatives: Cloning and characterization of a C4H from a Psoralen Producing Plant -*Ruta Graveolens* - Exhibiting Low Sensitivity to Psoralen Inactivation. *ABB,* 422 (1) : 71-80 (IF 2010 : 2,935).

.

2.8.3 Chapitres d'ouvrages

2019

Munakata, R., **Larbat, R**., Duriot, L., Olry, A., Gavira, C., Mignard, B., Hehn, A., Bourgaud, F. Polyphenols from plant roots: an expanding biological frontier. In Recent Advances in Polyphenol Research. Ed. Wiley.

2.8.4 Communications orales ou par voie d'affiche

2018

R. Larbat, M. Roumani, B. Simard, C. Paris, R. Duval Activité thérapeutique de métabolites spécialisés impliqués dans l'interaction tomate-*Tuta absoluta* (2018). Présenté à la conférence Biomolécule-Lorraine Université d'Excellence le 30 mai 2018.

Han, P, Desneux, N., Becker, C., **Larbat, R**., Le Bot, J., Adamowicz, S., Zhang J. Lavoir, A.V. Bottom-up effects of irrigation, fertilization and plant resistant traits on *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)*:* implications for the integrated management (2018). Présenté aux journées ADALEP, Sophia-Antipolis.

2017

R. Larbat, M. Royer, J. Le Bot, S. Adamowicz, P. Nicot, C. Robin (2017) Metabolic responses of tomato plants to *Pseudomonas syringae* infection under contrasted nitrogen availability. Conférence invitée lors du workshop CheckInBio tenu à Nice le 13-07-2017.

2016

R. Larbat, M. Royer, J. Le Bot, S. Adamowicz, P. Nicot, C. Robin (2016) Metabolic and physiological responses of tomato plants to *Pseudomonas sp.* infection under contrasted nitrogen availability. Communication orale et poster présentés au 11ème colloque de la Société Française de Biologie Végétale tenue à Angers du 6 au 8 juillet 2016.

Coqueret, V., **Larbat, R**., Unsicker, S., Gershenzon, J., Desneux, N., Adamowicz, S., Le Bot, J., Robin, C. (2016). Composition of volatile bouquet from tomato under herbivory by *Tuta absoluta*: day/night variations and influence of nitrogen availability. Présenté au Gordon Research Congress. Californie

2015

Haddouchi, F., Chaouche, T.M., Ksouri, R., Benmansour, A., **Larbat, R.** (2015). *Caractérisation des constituants antioxydants de* Phagnalon saxatile *subsp* saxatile *par CLHP-ESI-MS^n*. Présenté aux 2èmes Journées Internationales des Sciences de l'Agriculture, Environnement et Santé. Tlemcen Algérie.

Chaouche, T.M., Haddouchi, F., Ksouri, R., Atik-Bekara, F., **Larbat R.** (2015). *Le potentiel antioxydant de* Haloxylon articulatum *et l'identification de l'extrait actif par LC-ESI-M^n*. Présenté aux 2èmes Journées Internationales des Sciences de l'Agriculture, Environnement et Santé. Tlemcen, Algérie.

Chaouche, T.M., Haddouchi, F., Ksouri, R., Atik-Bekara, F., **Larbat R.** (2015). *Identification par HPLC-ESI-MS d'un extrait d'aiguille de* Juniperus oxycedrus *subsp* oxycedrus *obtenu par extraction par soxhlet*. Présenté aux 2èmes expositions ethnobotaniques et 3ème atelier d'initiation à la phytothérapie. Alger, Algérie.

Haddouchi, F., Chaouche, T.M., Ksouri, R., Benmansour, A., **Larbat, R**. (2015). *Analyse des phytonutriments naturels de* Phagnalon saxatile *subsp* saxatile *par LC-ESI-MS*. Presented at first International Congress of Nutrition and Food Science, from Bench to Bedside. Tlemcen, Algeria.

Chaouche, T.M., Haddouchi, F., Atik-Bekara, F, Ksouri, R., Azzi, R., **Larbat R.** (2015). *Identification of phytonutriments responsible for haemolytic and anti-radical effect from Cade*. Presented at first International Congress of Nutrition and Food Science, from Bench to Bedside. Tlemcen, Algeria

Coqueret, V., **Larbat, R**., Le Bot, J., Adamowicz, S., Robin, C. (2015). Impact de l'herbivorie de *Tuta absoluta* sur l'acquisition et la répartition des ressources carbonées et azotées chez la tomate. Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E 'Ressources Procédés Produits et Environnement', 15 janvier 2015

De Jaham, C., Thiombiano, B., Benard, C., Alonso, A., Cocuron, J., **Larbat, R.**, Cabasson, C., Vercambre, G., Bernillon, S., Colombie, S., Beauvoit, B., Andrieu, M.-H., Gibon, Y., Dieuaide Noubhani, M. (2015). Cellular and subcellular metabolomics reveal changes during tomato leaf development. In 9. Journées scientifiques du RFMF, Lille, FRA (2015-06-09 - 2015-07-11).

Soler, M., Plasencia, A., Lepikson-Neto, J., Dupas, A., Ladouce, N., Yu, H., Cassan-Wang, H., Rodrigues, J.C., Mounet, F, **Larbat, R.,** Grima-Pettenati, J. (2015). What MYB genes tell us about the specificities of woody plants? IUFRO Tree Biotechnology 2015 Conference, 8-12 June, Florence, Italy.

Soler, M., Plasencia, A., **Larbat, R.**, Pouzet, C., Jauneau, A., Soubigou-Taconnat, L., Rivas, S., Lapierre, C., Pesquet, E., Truchet, I., Grima-Pettenati, J., (2015). The Eucalyptus transcription factor EgMYB1 interacts with the histone linker EgH1 to modulate wood formation. IUFRO Tree Biotechnology 2015 Conference, 8-12 June, Florence, Italy.

Chougui, N., Djerroud, N., Naraoui, F., Hadjal, S., Aliane, K., Zeroual, B., **Larbat, R.** (2015). The effect of prickly pear by-products on the oxidation stability of margarine. November 16-18, 2015. San Francisco, USA.

2014

Chougui, N., Tamendjari, A., Richard, T., **Larbat, R.** (2014) Comparative study between seeds of spine and spineless *Opuntia ficus-indica.* The 2nd International Congress on Food Technology. November 05-07, 2014 Kuşadası/ Turkey

2012

M. Royer, **R. Larbat**, J. Le Bot, S. Adamowicz et C. Robin Is there a trade-off for C-resources allocation between growth and polyphenol accumulation in tomato under contrasted situations of carbon and nitrogen availabilities? Poster présenté lors de la 26ème conférence internationale sur les polyphénols du 22 au 26 juillet 2012 à Florence

B. Menin, A. Hehn, R. **Larbat,** B. Mignard, A. Olry, S. Lanteri et F. Bourgaud_Combined approaches to study hydroxycinnamoylquinic acid biosynthetic pathway in Sweetpotato. Poster présenté lors de la 26ème conférence internationale sur les polyphénols du 22 au 26 juillet 2012 à Florence.

R. Larbat, A. Hehn, S. Doerper, V. Sauveplane, C. N'Guyen, T. Courbariaux et F. Bourgaud Determining the structural basis for low sensivity of the Ruta graveolens C4H (CYP73A32) to psoralen suicide inhibition. Poster présenté lors du 11ème Symposium international sur les cytochromes P450 du 22 au 26 juin 2012 à Turin.

2010

R. Larbat Modélisation du métabolisme secondaire des plantes : Application à la voie de biosynthèse des polyphénols chez la tomate. Communication donnée lors des journées modélisation » organisées par le réseau Qualité du département EA les 22 et 23 Novembre 2010.

M. Génard, C. Robin, H. Gautier, C. Massot, C. Bénard, **R. Larbat**, N. Bertin, J. Le Bot, S. Adamlowicz et F. Bourgaud Elaboration de la qualité du fruit : composition, en métabolites primaires et secondaires. Les Carrefours de l'Innovation Agronomique, colloque « Qualité des fruits et légumes », Avignon 13 octobre 2010

R. Larbat How to optimize plant growth and phenolic acid content in tomato by the use of environmental factors? Conférence plénière présentée au laboratoire CORE à Stavanger en Avril 2010.

2009

R. Larbat, A. Hehn, S. Kellner, S. Doerper, A. Olry, U. Matern et F. Bourgaud Functional characterization of new P450s involved in plant furanocoumarins biosynthesis and possible applications in a metabolic engineering approach. Conférence plénière présentée au 4th Conference of Polish Society of Experimental Plant Biology Crakovie Pologne en Septembre 2009

R. Larbat, A. Hehn, S. Schneider, H. Jugdé, B. Schneider, U. Matern et F. Bourgaud Characterization of angelicin synthase a cytochrome P450 monooxygenase involved in the furanocoumarins biosynthesis pathway. Conférence plénière donnée à l'occasion du 8ème meeting de la Société française de biologie végétale à Strasbourg du 8 au 10 juillet 2009.

R. Larbat, A. Hehn, S. Schneider, H. Jugdé, B. Schneider, U. Matern et F. Bourgaud Molecular and enzymatic characterization of angelicin synthase a P450 involved in the biosynthesis of angular furanocoumarins. Poster présenté lors du 8ème meeting de la Société française de biologie végétale à Strasbourg du 8 au 10 juillet 2009.

2008

R. Larbat, A. Hehn, J. Hans, H. Jugdé, B. Schneider, U. Matern et F. Bourgaud. New P450s involved in plant furanocoumarins biosynthesis. Conférence plénière donnée par F. Bourgaud à l'occasion du 9ème symposium international de biodiversité et biotechnologie des P450 de Nice du 8 au 12 Juin 2008.

2007

R. Larbat, A. Hehn, D. Werck-Reichhart et F. Bourgaud Cloning and functional identification of CYP71AJ1 orthologs metabolizing linear and angular furanocoumarins. Poster présenté lors de la 15ème conférence internationale sur les cytochromes P450 s'étant tenue à Bled du 17 au 21 juin 2007.

2006

R. Larbat, S. Kellner, A. Hehn, E. Gontier, J. Hans, U. Matern and F. Bourgaud. Heterologous expression and functional characterization of psoralen synthase, the first P450 monooxygenase involved in furanocoumarin biosynthesis. Poster présenté lors du 8ème congrès international de biodiversité et biotechnologie des P450 de Swansea du 23 au 27 Juillet 2006.

3 Caractérisation de la voie de biosynthèse des furocoumarines

3.1 Quelques mots sur les composés phénoliques

3.1.1 Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites spécialisés synthétisés par les plantes et les microorganismes. Chez les plantes, ils constituent une des trois familles majeures du métabolisme spécialisé, avec les alcaloïdes et les terpènes. Les composés phénoliques végétaux se définissent par (*i*) une structure contenant un ou plusieurs cycles phényl portant un ou plusieurs groupements hydroxyl et (*ii*) une voie de biosynthèse issue de la voie des phénylpropanoïdes ou de la voie des polykétides (Quideau et al., 2011; Lattanzio, 2013).

Les composés phénoliques constituent la famille de métabolites spécialisés la plus largement répandue dans le règne végétal. Ce caractère ubiquiste est souvent expliqué par le rôle potentiellement important de ces composés phénoliques dans la colonisation des continents par les plantes au Silurien (-430 à -400 Ma), *via* leurs propriétés de protection des rayons UV (Popper et al., 2011).

La diversité structurale des composés phénolique fait écho à la diversité des rôles écologiques qui leur ont été attribués. Le tableau 5 résume sommairement les nombreuses sous-familles de composés phénoliques et leurs rôles écologiques connus. Les composés phénoliques regroupent ainsi des structures relativement simples, constituées d'un cycle phénol plus ou moins substitué, comme l'acide salicylique ou le phloroglucinol, et des structures beaucoup plus complexes, comme les polymères de polyphénols constituant la lignine. En plus de leurs rôles essentiels dans la protection des UV (flavonoïdes) et le port érigé des plantes terrestres (lignines), les composés phénoliques jouent un grand rôle dans l'interaction des plantes avec leur environnement. Ces composés sont ainsi impliqués dans l'attraction visuelle (flavonoïdes) et olfactive (acides phénoliques) des pollinisateurs, la mise en place de symbiose avec des micro-organismes (isoflavonoïdes), l'acquisition d'éléments minéraux (coumarines) ainsi que la défense contre des stress biotiques et abiotiques. Sur ce dernier aspect, l'ensemble des sous-familles est concerné que ce soit au travers de leurs propriétés allélopathiques, antimicrobiennes, insecticides ou antioxydantes pour limiter l'impact des espèces oxygénées réactives générées lors des stress.

3.1.1 Biosynthèse des composés phénoliques

La biosynthèse des composés phénoliques végétaux emprunte soit la voie du shikimate/phénylpropanoïdes (acides hydroxycinnamiques, monolignols etc…), soit la voie des polykétides pour la synthèse de composés phénoliques simples ou acylés (sorgoléone), soit une combinaison des deux voies (flavonoïdes, stilbènes, etc...). La description qui sera donnée ici sera centrée sur la première voie du fait de son importance et son caractère unique au règne végétal.

Squelette de base	Sous-familles	Rôles écologiques
C_6	Phénols simples, benzoquinones	Allélopathie, défense
C_6-C_1	Acides phénoliques	Allélopathie, défense
C_6-C_2	Acétophénones, acides phénylacétiques	Allélopathie, défense
C_6-C_3	Acides hydroxycinnamiques, coumarines, phénylpropanes	Allélopathie, défense, Nutrition Fe
C_6-C_4	Naphtoquinones	Allélopathie, défense
C_6-C_1-C_6	Xanthones	Défense
C_6-C_2-C_6	Stilbènes, anthraquinones	Défense
C_6-C_3-C_6	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Attraction pollinisateurs, symbioses, défense, protection UV
$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanes	Défense
$(C_6$-$C_3)_n$	Lignines	Structure, défense
$(C_6$-C_3-$C_6)_n$	Tannins condensés	Défense

Tableau 5 : Principales sous-familles de composés phénoliques et rôles écophysiologiques associés.
Les sous-familles sont définies en fonction de leur structure de base allant d'un cycle aromatique simple (C6) à des formes oligomérisées $(C6\text{-}C3\text{-}C6)_n$.

La figure 2 représente schématiquement les voies du shikimate et des phénylpropanoïdes ainsi que les embranchements majeurs menant aux principales sous-familles de composés phénoliques végétaux. La voie du shikimate existe chez les microorganismes et les plantes. Elle conduit à la synthèse des acides aminés aromatiques, tryptophane, tyrosine et phénylalanine à partir de phosphoenolpyruvate et d'érythrose-4-phosphate. Chez les plantes, la phénylalanine (et la tyrosine chez les monocotylédones) est le point d'entrée principal dans la voie des phénylpropanoïdes. La première étape de cette voie consiste en une déamination de la phénylalanine par la phénylalanine ammonia lyase (PAL) pour donner de l'acide cinnamique. Ce dernier est hydroxylé en acide *p*-coumarique par un cytochrome P450, la cinnamate-4-hydroxylase (C4H). L'acide *p*-coumarique est ensuite estérifié avec un co-enzyme A par la 4-coumarate ligase (4CL). La succession de ces trois étapes enzymatiques constitue la voie générale des phénylpropanoïdes qui est présente chez tous les végétaux supérieurs.

A l'exception de la C4H, ces activités enzymatiques sont associées à de petites familles de gènes chez toutes les plantes. Ainsi, 4 gènes de PAL ont été identifiés chez Arabidopsis, 9 chez le riz, et plus d'une vingtaine chez la tomate, bien que dans ce dernier cas, une majorité soit des pseudogènes (Chang et al., 2008; Cochrane et al., 2004; Zhu et al., 1995). Pour la 4CL, de 2 (*Petroselinum crispum*) à 20 gènes (*Populus sp.*) ont pu être identifiés (Douglas et al., 1987; Zhang et al., 2015). Les gènes de ces familles multigéniques se caractérisent par des expressions spatio-temporelles souvent spécifiques et complémentaires et sont probablement associés à des fonctions différentes (Olsen et al., 2008). Dans le cas de la C4H, une majorité de plantes ne dispose que d'un seul gène dont la mutation conduit à des phénotypes très marqués (Schilmiller et al., 2009).

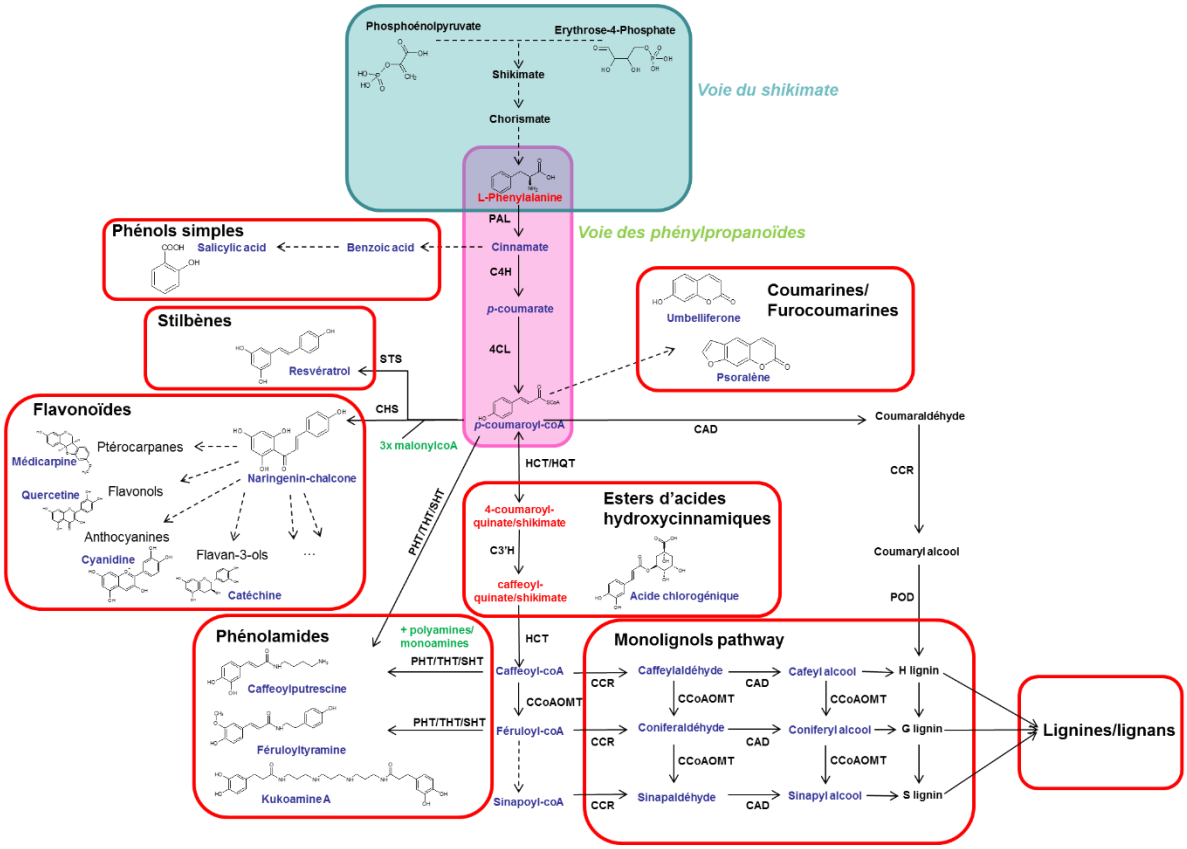


Figure 2 : Représentation schématique des voies de biosynthèse du shikimate et des phénylpropanoïdes.
La voie du shikimate, dans le cadre bleu est présentée brièvement avec les deux substrats initiaux (phosphoénolpyruvate et erythrose-4-phosphate) ainsi que les intermédiaires les plus importants. La voie de phénylpropanoides (en rose) correspond au tronc commun à la synthèse de toutes les sous-familles (cadres rouges), dont quelques métabolites sont présentés en exemple. Les flèches pleines correspondent à une seule étape, tandis que les flèches en pointillés représentent une succession d'étapes enzymatiques. PAL : Phenylalanine ammonia lyase ; C4H : Cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate-CoA ligase ; HCT : Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxyCinnamoyl Transferase ; HQT : Hydroxycinnamoyl-CoA Quinate hydroxycinnamoyl Transferase ; C3'H : p*-Coumaroyl-quinate/shikimate Hydroxylase ; PHT : Putrescine Hydroxycinnamoyl Transferase ; SHT : Spermine/spermidine Hydroxycinnamoyl Transferase ; THT : Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase ; CCoAOMT : Caffeoyl-CoA O-methyl-transferase ; CCR : Hydroxycinnamoyl-CoA reductase ; CAD : Cinnamyl Aalcool Dehydrogenase ; STS : STtilbene Synthase ; CHS : CHalcone Synthase.*

Le *p*-coumaroyl-coA produit par la 4CL constitue un point d'embranchement majeur dans la synthèse des composés phénoliques. C'est l'un des substrats de la chalcone synthase (CHS) et de la stilbène synthase (STS), deux polyketides synthases de type III, ouvrant vers la synthèse des flavonoïdes et dérivées (aurones, anthocyanes, ptérocarpanes, flavon-3-ols…) et des stilbènes. Le *p*-coumaroyl-coA alimente également la voie de biosynthèse des monolignols (unités H, S et G), briques élémentaires de la lignine. Comme les autres esters de coA (féruloyl-coA, caféoyl-coA), le *p*-coumaroyl-coA constitue un substrat pour plusieurs acyl-transférases comme l'HydroxyCinnamoyl-CoA Transferase (HCT) et l'Hydroxycinnamoyl-CoA Quinate hydroxycinnamoyl Transferase (HQT) ouvrant à la synthèse d'une variété d'esters d'acides hydroxycinnamiques, comme l'acide chlorogénique, ou bien les Tyramine Hydroxycinnamoyl-coA Transferase (THT), Spermidine Hydroxycinnamoyl-coA Transferase (SHT) ou Putrescine Hydroxycinnamoyl-coA Transferase (PHT) menant à la synthèse des phénolamides.

Les voies de biosynthèse menant aux composés phénoliques les plus largement représentés, comme celles de la lignine, des flavonoïdes ou bien de l'acide chlorogénique sont

maintenant bien caractérisées. En revanche, dans le cas de métabolites dont la représentation est plus restreinte (faible distribution dans les familles végétales, présence dans des tissus ou des conditions très spécifiques), les connaissances sur leur synthèse sont plus fragmentaires. Un travail pionnier de caractérisation de ces voies métaboliques est donc essentiel. C'est le cas de la voie de biosynthèse des furocoumarines une sous-famille de composés phénoliques sur laquelle j'ai porté mon attention depuis la thèse. Les principales avancées de ces travaux seront décrites dans la suite de ce chapitre.

3.2 Elucidation de la voie des furocoumarines

3.2.1 Présentation des furocoumarines

Les furocoumarines sont des composés phénoliques constitués d'un noyau coumarine (benzo-α-pyrone) sur lequel est greffé un cycle furane (Bourgaud et al., 2006). Suivant la position du furane sur les carbones C6-C7 ou C7-C8 du noyau coumarine, on distingue respectivement les furocoumarines « linéaires » (psoralène et dérivés) des furocoumarines « angulaires » (angélicine et dérivés). Ces molécules ont été principalement décrites dans 4 familles taxonomiques de végétaux supérieurs : Apiacées, Rutacées, Fabacées et Moracées. Cependant, le développement d'outils d'analyses exhaustives du métabolisme a permis leur détection, à des niveaux relativement faibles dans de nombreuses autres espèces végétales (Munakata et al., 2019).

Les furocoumarines sont des phytoalexines, destinées à protéger la plante contre des prédateurs microbiens et herbivores. Elles sont également impliquées dans des processus d'allélopathie (Junttila, 1976). Les furocoumarines sont des molécules phototoxiques, capables d'établir des liaisons covalentes de manière UV-dépendante avec les thymines de l'ADN, bloquant ainsi les mécanismes de duplication et de transcription (Musajo et al., 1966). Les furocoumarines peuvent également établir des liaisons avec d'autres constituants cellulaires comme les lipides insaturés ou des acides aminés cycliques (Dall'Acqua and Martelli, 1991). Cette multiplicité de cibles potentielles peut induire de multiples effets physiologiques qui suscitent encore de nos jours un fort intérêt pour ces molécules dans le domaine pharmaceutique. Les furocoumarines linéaires sont aujourd'hui utilisés dans les traitements de maladies de peau comme le psoriasis ou le vitiligo (Gambichler et al., 2005; Zabolinejad et al., 2019).

La voie de biosynthèse des furocoumarines a été d'abord caractérisée d'un point de vue biochimique, à partir des années 1970, par l'utilisation de précurseurs radiomarqués permettant d'identifier les intermédiaires de la voie (Brown and Steck, 1973; Caporale et al., 1981a; Hamerski and Matern, 1988b; Stanjek et al., 1997, 1999) (Fig. 3). Elle dérive de la voie générale des phénylpropanoïdes décrite précédemment. L'*ortho*-hydroxylation du *p*-coumaroyl-coA pour donner l'umbelliférone, constitue l'entrée dans la voie spécifique des furocoumarines. L'umbelliférone est prénylée sur les carbones 6 ou 8 pour mener aux formes linéaires ou angulaires. L'étape suivante est la cyclisation de la chaine isoprène, à l'origine du cycle furane. Cela donne la (+)-marmésine (linéaire) et la (+)-columbianétine (angulaire). Ces deux molécules constituent les précurseurs directs du psoralène et de l'angélicine. Ces deux formes les plus simples de furocoumarines sont ensuite « décorées » par l'addition de groupement hydroxy, méthoxy, géranyloxy donnant lieu à toute la diversité structurale de cette classe de métabolites (Bourgaud et al., 2006).

Au début des années 2000, les connaissances mécanistiques de cette voie étaient limitées. En 2004, seul un gène codant pour une bergaptol-O-méthyl-transférase avait été cloné et caractérisé d'un point de vue fonctionnel (Hehmann et al., 2004). Pour les étapes plus en amont de la voie, les travaux de Hamerski et Matern avaient permis d'isoler les activités enzymatiques de la marmésine synthase, de la psoralène synthase et de la psoralène-5-monooxygénase (Fig. 3) et d'apporter la preuve expérimentale que ces enzymes étaient des cytochromes P450 (Hamerski and Matern, 1988a, 1988b). Pour autant, aucun gène n'avait été identifié.

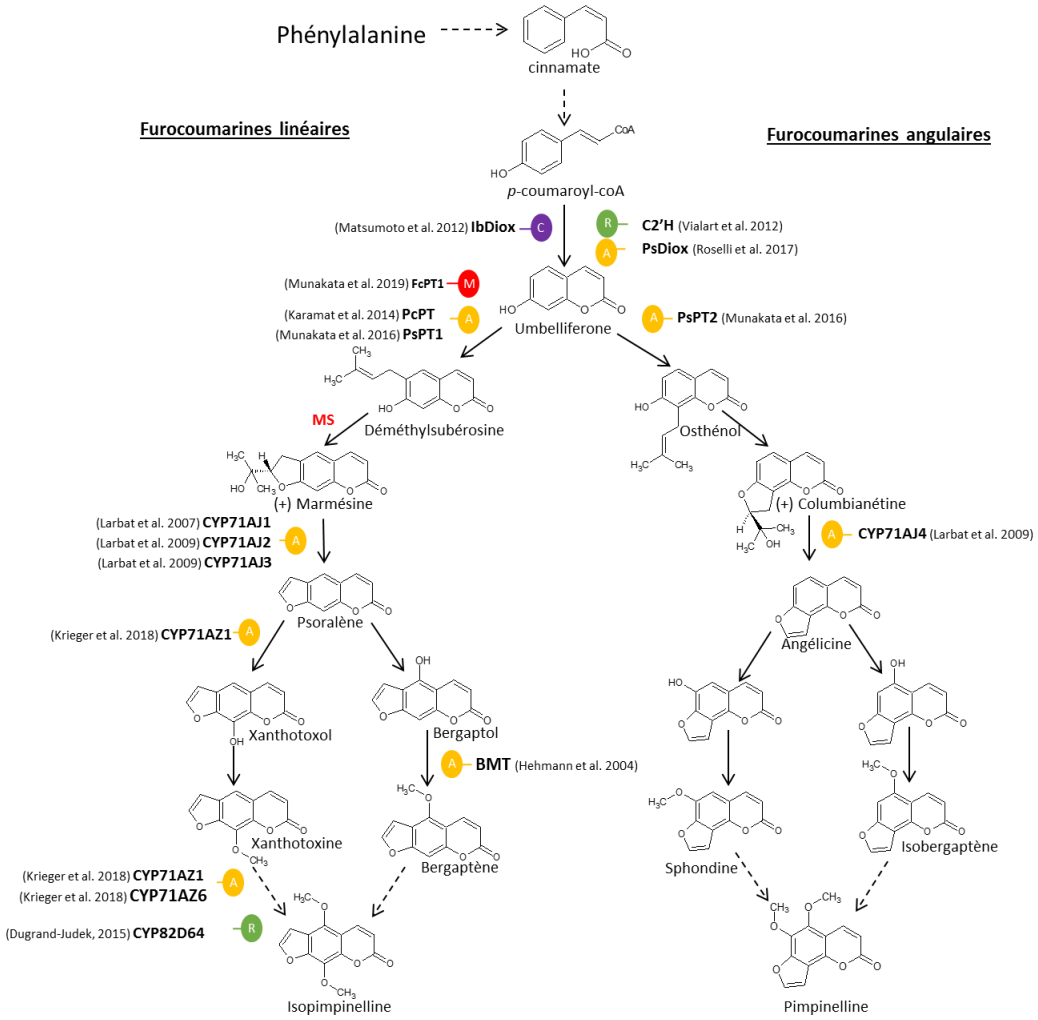


Figure 3 : Schéma de la voie de biosynthèse des furocoumarines linéaires et angulaires.
Les flèches continues correspondent à une étape enzymatique, tandis que les flèches en pointillés représentent une succession d'étapes. Les gènes identifiés dans la voie de biosynthèse sont représentés ainsi que la famille botanique dont ils sont issus (R : Rutacée ; A : Apiacées ; M : Moracées ; C : Convolvulaceae). L'étape marmésine synthase (MS) représentée en rouge, correspond au chainon manquant dans la succession des gènes identifiés permettant la synthèse de psoralène et xanthotoxol à partir de la phénylalanine.

Les cytochromes P450 (P450) constituent une superfamille[1] d'enzymes présentes chez presque tous les organismes vivants et très abondantes chez les végétaux (272 gènes référencés chez Arabidopsis et 458 chez le riz). Chez les eucaryotes, ces enzymes sont majoritairement associées à la membrane du réticulum endoplasmique par le biais de leur extrémité N-terminale. Ce sont des monooxygénases catalysant principalement des réactions d'hydroxylation,

[1] Regroupement le plus large de protéines pour lequel il est possible d'identifier un ancêtre commun par homologie.

d'époxydation mais aussi parfois de décarboxylation. Chez les plantes, un grand nombre de P450 sont impliqués dans le métabolisme spécialisé.

Dans l'optique de caractériser la voie des furocoumarines au niveau moléculaire, nous nous sommes orientés, en premier lieu, vers la recherche de gènes de P450. Ce choix s'est justifié car leur implication dans cette voie de biosynthèse était prouvée chez les Apiacées (Hamerski and Matern, 1988b).

Une voie unique, des modèles multiples

Les furocoumarines sont présentes dans un faible nombre d'espèces végétale et absentes des espèces les plus étudiées et pour lesquelles les données génomiques sont disponibles (Arabidopsis, maïs, vigne, tomate…). Pour contourner ce problème, la stratégie de l'équipe a été de multiplier ses modèles d'étude en travaillant à la fois sur des Rutacées (*Ruta graveolens*, *Citrus paradisi*), des Apiacées (*Ammi majus*, *Pastinaca sativa*, *Apium graveolens*) et plus récemment sur Moracées (*Ficus carica*), au gré des collaborations et des inspirations. Cette stratégie s'est montrée payante puisque depuis 2007, les travaux de l'équipe ont mené à l'identification des 11 nouveaux gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse. N'ayant pas été impliqué dans chacune de ces belles histoires, je me focaliserai dans un premier temps sur mes contributions majeures et rappellerai plus succinctement l'ensemble des contributions de l'équipe.

3.2.2 CYP71AJ1, premier gène de P450 codant une psoralène synthase

Contributeurs : F. Bourgaud (Pr. LAE), A. Hehn (Pr. LAE), S. Kellner (Doct. U. Marburg), R. Larbat (Doct. LAE), U. Matern (Pr. U. Marburg)

3.2.2.1 Identification de gènes candidats

Le projet d'identification de gènes impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines a été initié en 2000 au laboratoire. Ce projet faisait suite à plusieurs années portant sur l'étude écophysiologique et agronomique de différentes espèces de Rutacées dont la rue officinale (*Ruta graveolens*), une plante buissonnante du bassin méditerranéen présentant des propriétés médicinales en lien notamment avec sa capacité à accumuler des concentrations importantes en furocoumarines dans ses tissus (Milesi, 2001 ; Massot, 2001). Une perspective de ce projet était d'évaluer l'utilisation de *Ruta graveolens* comme système de production de ces métabolites secondaires utilisés en dermatologie. Les rendements de production en système plante entière, ainsi qu'en culture cellulaire ayant été estimée comme économiquement non rentables, la stratégie était donc d'augmenter la production de ces molécules par une approche de transgénèse. Pour cela, il était donc important de cloner des gènes clé de la voie des furocoumarines chez *Ruta graveolens*.

En l'absence de données génomiques ou transcriptomiques, l'approche idéale consistait à identifier des gènes candidats par criblage différentiel. Pour cela, il était important de disposer d'un matériel végétal dont le niveau de synthèse en furocoumarines pouvait être modulé d'un niveau très faible, voire nul, à un niveau important. La recherche par PCR de gènes de P450 présents seulement dans les tissus accumulant des furocoumarines permettrait ainsi d'identifier des gènes candidats codant des enzymes dont la fonction pourrait être étudiée après expression hétérologue dans un système levure et un criblage fonctionnel *in vitro*.

Malheureusement, les cellules en cultures de *Ruta graveolens* se sont révélées être un mauvais système pour l'approche de criblage différentiel dans la mesure où elles accumulaient des furocoumarines de manière constitutive (Gravot, 2002 ; Larbat, 2006).

Une alternative a été de travailler sur des cellules en culture d'*Ammi majus*, une Apiacée synthétisant des furocoumarines linéaires. Chez la plante, la synthèse est induite en réponse à des stress biotiques et abiotiques. Les cellules en culture d'*Ammi majus* ont également la capacité d'induire la synthèse de furocoumarines en réponse à divers stress et notamment en présence d'extraits du champignon *Phytophtora sojae*. Ce matériel végétal avait été mis au point par l'équipe du professeur Ulrich Matern de l'Université de Marburg. Ils avaient validé l'utilisation d'une approche de criblage différentielle sur ce matériel par la caractérisation d'un premier gène impliqué dans la voie des furocoumarines (bergaptol-O-méthytransférase, Hehmann et al., 2004) et l'identification de 5 séquences de gènes codant des P450 spécifiquement exprimés dans ces cellules élicitées (S. Kellner, 2008). La caractérisation fonctionnelle de ces P450 a constitué un premier travail collaboratif entre nos deux équipes et a représenté l'un des axes de recherche de ma thèse. L'un de ces P450, nommé CYP71AJ1, présentait un profil d'induction corrélant parfaitement avec l'accumulation de psoralène dans les cultures cellulaires élicitées (Fig. 4). Sa caractérisation constituait une priorité.

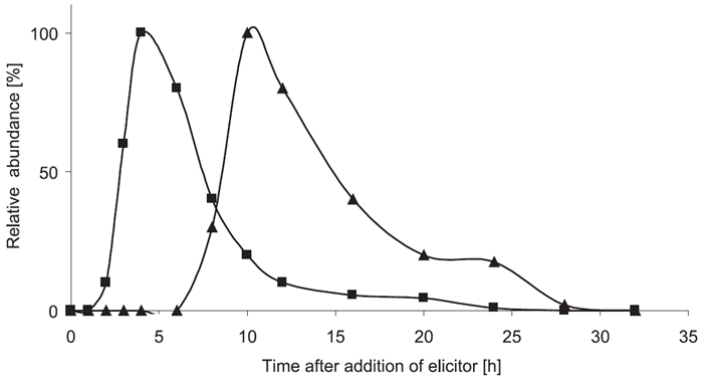


***Figure 4 : Profil d'expression du gène* CYP71AJ1 *et d'accumulation de psoralène dans les cellules en culture d'*Ammi majus *élicitées par l'ajout d'extraits de* Phytophthora sojae**.
L'expression de CYP71AJ1 *(carrés noirs) est induite 2h après l'élicitation pour atteindre un maximum à 4h post élicitation. L'accumulation de psoralène (triangles noirs) est élicitée 8h après l'élicitation et atteint un maximum à 10h. Issue de Larbat et al. (2007).*

3.2.2.2 Identification de la fonction de CYP71AJ1

Afin d'identifier sa fonction, l'enzyme codée par le gène *CYP71AJ1* a été produite dans un système d'expression hétérologue de levure (souche WAT11, Pompon et al., 1996). Les P450 sont des enzymes associées à la membrane du réticulum endoplasmique. Les tests d'activité enzymatique sont réalisés sur la fraction microsomale des levures broyées, qui correspond à une fraction enrichie en membrane. La fonction de cette enzyme a été étudiée en testant une vingtaine de substrats comprenant principalement des intermédiaires de synthèse des furocoumarines et des coumarines. Ce criblage fonctionnel a mis en évidence que la (+)-marmésine est métabolisée par CYP71AJ1 en un produit identifié en spectrométrie de masse comme étant du psoralène, confirmant ainsi que CYP71AJ1 catalyse l'activité psoralène synthase (Fig. 5).

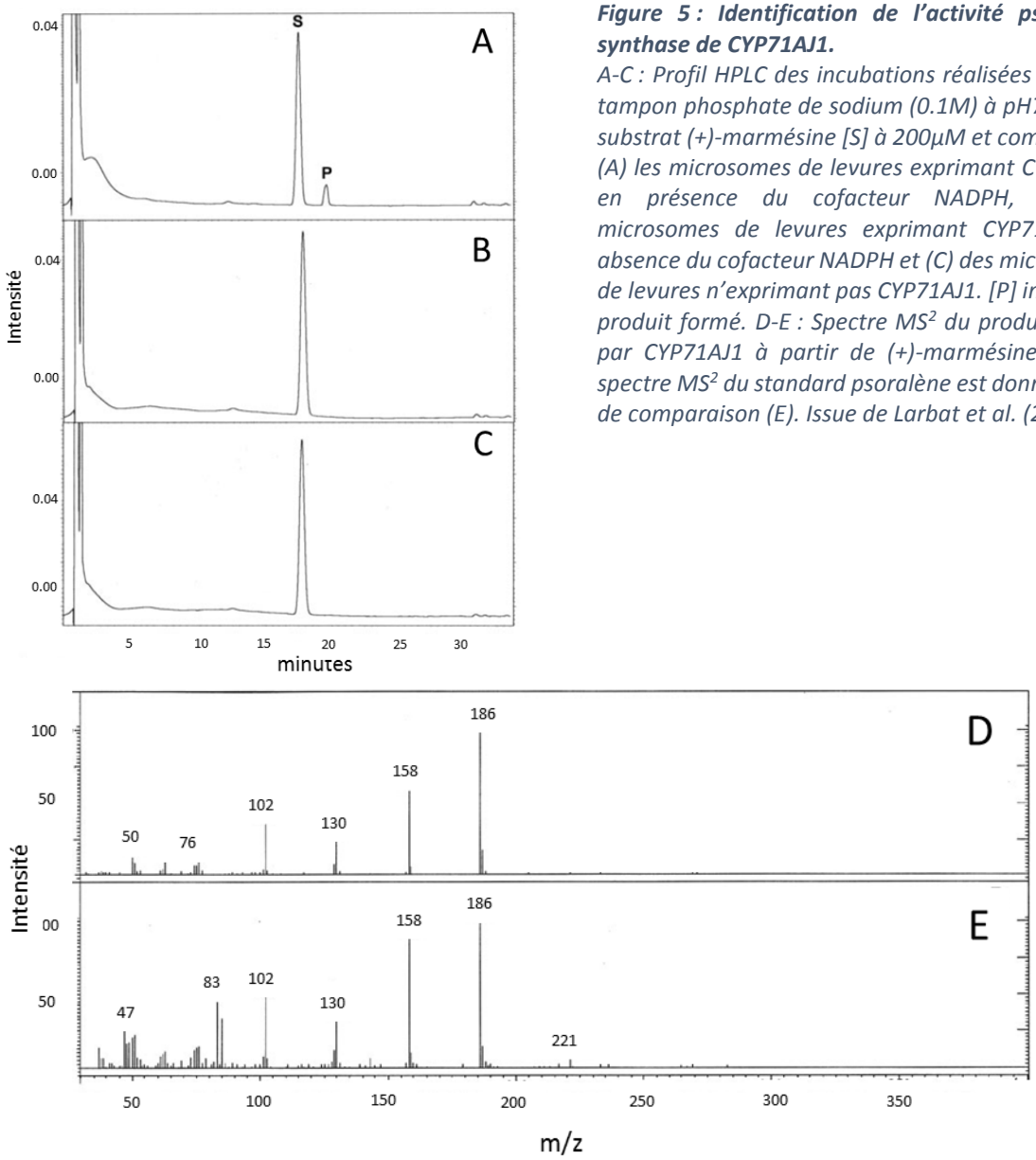


Figure 5 : Identification de l'activité psoralène synthase de CYP71AJ1.

A-C : Profil HPLC des incubations réalisées dans un tampon phosphate de sodium (0.1M) à pH7 avec le substrat (+)-marmésine [S] à 200µM et comprenant (A) les microsomes de levures exprimant CYP71AJ1 en présence du cofacteur NADPH, (B) les microsomes de levures exprimant CYP71AJ1 en absence du cofacteur NADPH et (C) des microsomes de levures n'exprimant pas CYP71AJ1. [P] indique le produit formé. D-E : Spectre MS^2 du produit formé par CYP71AJ1 à partir de (+)-marmésine (D). Le spectre MS^2 du standard psoralène est donné à titre de comparaison (E). Issue de Larbat et al. (2007).

CYP71AJ1 constitue le premier P450 cloné impliqué dans la voie de biosynthèse des furocoumarines. Les propriétés enzymatiques déterminées *in vitro* (K_m 1.5µM, K_{cat} 340 min^{-1}) sont en accord avec une fonction physiologique de CYP71AJ1 dans la synthèse de psoralène. La parfaite corrélation entre le profil d'induction du gène et l'accumulation de furocoumarines dans les cellules d'*Ammi majus* ainsi que l'absence d'inhibition significative de l'enzyme par les furocoumarines, supporte l'idée qu'*in vivo*, l'activité psoralène synthase est principalement contrôlée au niveau de la transcription du gène *CYP71AJ1*.

3.2.3 La famille de P450 CYP71AJ est impliquée dans la synthèse des furocoumarines linéaires et angulaires chez les Apiacées

Contributeurs : F. Bourgaud (Pr. LAE), A. Hehn (Pr. LAE), H. Jugdé (IE, LAE), R. Larbat (CR LAE), U. Matern (Pr. U. Marburg), B. Schneider (MPI Jena),

L'identification de CYP71AJ1 comme premier P450 de la voie des furocoumarines a permis d'explorer l'hypothèse selon laquelle les P450 menant aux furocoumarines angulaires seraient

très proches de ceux menant aux furocoumarines linéaires. Les furocoumarines angulaires ont fait l'objet de moins de travaux que les formes linéaires, en raison sans doute de leur plus faible représentation dans le monde végétal (ces formes sont restreintes à quelques espèces d'Apiacées et de Fabacées) et également par leur intérêt pharmaceutique plus limité. Plusieurs travaux portant sur l'interaction plante x insecte ont posé l'hypothèse que les furocoumarines angulaires pourraient avoir dérivé des furocoumarines linéaires et constituer une évolution défensive efficace contre les insectes capables de s'accommoder des furocoumarines linéaires (Berenbaum and Feeny, 1981). Cette hypothèse est basée sur le fait que (*i*) toutes les plantes produisant des furocoumarines angulaires produisent également des formes linéaires, (*ii*) le mélange furocoumarines angulaire/linéaire est plus toxique pour les larves d'insecte et (*iii*) les étapes catalytiques impliquées dans la formation des formes angulaires sont les mêmes que celles des linéaires et pourraient être catalysées par des enzymes très proches.

Notre objectif était d'étudier cette hypothèse évolutive et de contribuer à une meilleure caractérisation de la voie des formes angulaires.

3.2.3.1 Analyse structure-fonction de CYP71AJ1 en présence de columbianetine

Le criblage fonctionnel de CYP71AJ1 a montré que de la (+)-columbianetine, équivalent angulaire de la (+)-marmésine, n'est pas métabolisée par l'enzyme. En revanche, j'ai mis en évidence que cette molécule est un inhibiteur compétitif de l'enzyme (K_i 225µM), ce qui indique qu'elle est capable d'entrer dans le site actif de CYP71AJ1. Par la création d'un modèle structural de l'enzyme CYP71AJ1 et par des simulations d'ancrage de substrats potentiels dans le site actif, j'ai confirmé que la (+)-columbianétine et la (+)-marmésine peuvent se positionner de manière similaire dans le site actif. Cependant, la structure angulaire de la (+)-columbianetine positionne le C réactif trop loin de l'hème, empêchant tout acte catalytique (Fig. 6). Ces observations laissent supposer que quelques modifications mineures du site actif de CYP71AJ1 pourraient permettre la métabolisation de cette furocoumarine angulaire.

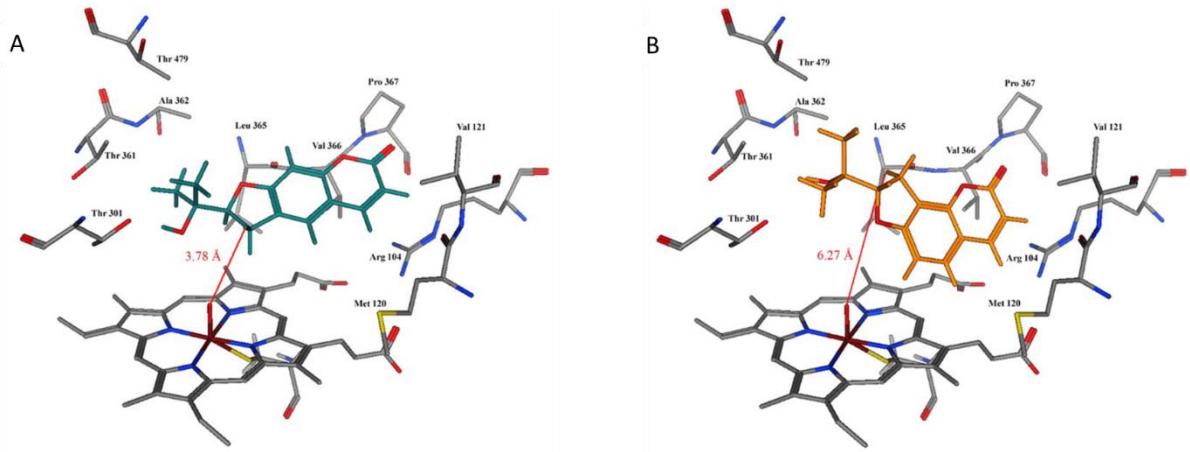


Figure 6 : Simulation d'ancrage de la (+)-marmésine (A) et de la (+)-columbianétine (B) dans le site actif d'un modèle tridimensionnel de CYP71AJ1.

Les acides aminés qui constituent le site actif et l'hème à l'état fer-oxo sont représentés en gris avec des atomes rouges d'oxygène et d'azote bleu. Le mode d'ancrage le mieux classé pour (+)-marmésine (A; représenté en vert) place le syn-hydrogène en C3' à 3,78 Å de l'oxygène réactif du fer-oxo de l'hème. En revanche, dans le cas de la (+)-columbianétine (B) l'hydrogène du C3 est positionné à 6.27 Å du fer-oxo. Issue de Larbat et al. (2007).

3.2.3.2 Caractérisation d'orthologues de CYP71AJ1 chez des Apiacées productrices de furocoumarines angulaires

J'ai voulu étudier la spécificité de substrat d'orthologues de CYP71AJ1 chez le céleri (*Apium graveolens*) et le panais (*Pastinaca sativa*), deux Apiacées synthétisant des furocoumarines linéaires et angulaires. La proximité phylogénétique de ces deux plantes avec *Ammi majus*, m'a permis de rechercher les séquences orthologues par PCR en utilisant des amorces spécifiques de CYP71AJ1. Par cette méthode, j'ai isolé trois séquences complètes de P450 à partir d'ADNc de feuilles de céleri et de panais soumis à un stress mécanique. Ces séquences présentent plus de 60% d'homologie protéique avec CYP71AJ1 ce qui en fait trois nouveaux membres de la sous-famille CYP71AJ (CYP71AJ2 chez le céleri, CYP71AJ3 et 4 chez le panais). CYP71AJ2 et CYP71AJ3 présentent une forte homologie protéique avec CYP71AJ1 (respectivement 89% et 82%) alors que cette homologie tombe à 70% dans le cas de CYP71AJ4.

J'ai fait exprimer ces trois nouveaux P450 par la levure WAT11, puis testé leur activité en présence de plusieurs substrats (coumarines, furocoumarines linéaires et angulaires). Ces tests révèlent que CYP71AJ2 et CYP71AJ3 présentent tous deux la même activité psoralène synthase que CYP71AJ1, avec une affinité comparable pour la (+)-marmésine (0.54µM pour CYP71AJ2, 1.3µM pour CYP71AJ3, 1.5µM pour CYP71AJ1).

CYP71AJ4 n'a pas la capacité de synthétiser du psoralène à partir de (+)-marmésine. En revanche, les tests *in vitro* indiquent que cette enzyme est capable de métaboliser la (+)-columbianétine pour donner deux produits. Le premier produit est identifié comme étant de l'angélicine, le second comme étant de la (+)-columbianétine hydroxylée sur le groupement isopropyloxy (Fig. 7). La mesure des paramètres catalytiques indique une réaction plus efficace en faveur de la formation d'angélicine (K_m 2.1µM, K_{cat} 112min^{-1} pour la formation d'angélicine contre K_m1.4µM et K_{cat} 18.9min^{-1} pour la formation de columbianétine hydroxylée).

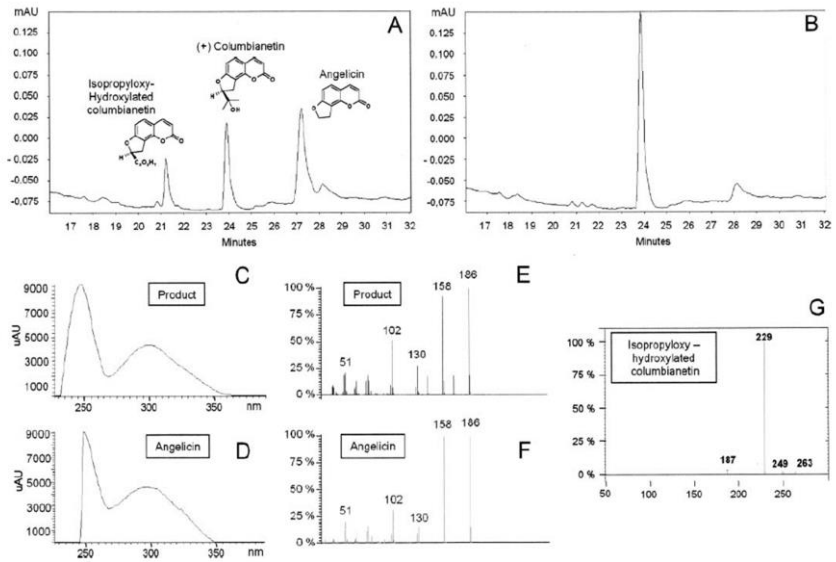


Figure 7 : Caractérisation fonctionnelle de CYP71AJ4 en présence de (+)-columbianétine.
A-B : Profil HPLC des incubations réalisées dans un tampon phosphate de sodium (0.1M) à pH7 avec le substrat (+)-columbianétine à 200µM et comprenant (A) les microsomes de levures exprimant CYP71AJ4 en présence du cofacteur NADPH, (B) les microsomes de levures exprimant CYP71AJ1 en absence du cofacteur NADPH. Le spectre UV et le profil de fragmentation MS2 du produit sortant à 27.5 min (C et E) sont comparés à ceux de l'angélicine. Le profil MS2 de la (+)-columbianétine hydroxylée est décrite en (G). Issue de Larbat et al. (2009).

Ces travaux combinant des approches de biologie moléculaire, d'enzymologie et de bioinformatique ont fourni des informations majeures sur la compréhension de la voie de biosynthèse des furocoumarines linéaires et angulaires (Fig. 1). Nous avons montré (*i*) que l'activité psoralène synthase est codée par les gènes *CYP71AJ1*, *2* et *3* respectivement chez *Ammi majus*, le céleri et le panais et (*ii*) que CYP71AJ4 catalyse l'activité angélicine synthase. Ces résultats montrent avant tout que l'évolution d'isoformes au sein de la même sous-famille CYP71AJ contrôle la spécificité pour les furocoumarines linéaires et angulaires ce qui semble aller dans le sens d'une évolution des gènes existants vers des gènes impliqués dans une nouvelle voie de biosynthèse (linéaire vers angulaire).

3.2.4 2009-2015 : des avancées majeures pour l'équipe MII

A la suite des travaux mentionnés plus haut et qui ont été réalisés et valorisés au cours de ma thèse et de mes deux premières années en tant que chargé de recherche, j'ai délaissé la thématique sur la voie des furocoumarines pendant quelques années pour développer la thématique, qui sera présentée au chapitre suivant, concernant la régulation du métabolisme spécialisé par l'environnement biotique et abiotique. Durant cette période, des avancées importantes ont été réalisées par l'équipe sur la compréhension de la voie des furocoumarines. Une première avancée a été réalisée, en collaboration avec l'université de Kobe (Pr. M. Mizutani), par l'identification du gène codant pour une dioxygénase catalysant l'*ortho*-hydroxylation du *p*-coumaroyl-coA, étape clef de la biosynthèse de l'umbelliferone et des furocoumarines chez *Ruta graveolens* (Fig. 3). J'ai contribué à ce travail, *a minima*, par la construction d'une banque de cDNA de feuilles de *Ruta graveolens* à partir de laquelle le gène a été cloné (Vialart et al., 2012). Par la suite, l'équipe a identifié des gènes contrôlant la prénylation de l'umbelliferone permettant d'orienter la synthèse soit vers les furocoumarines linéaires soit vers les furocoumarines angulaires. Ainsi, chez le persil, qui ne produit que des furocoumarines linéaires, une umbelliferone dimethylallyl transferase (UDT) catalyse spécifiquement la prénylation de l'umbelliferone en C6 (Karamat et al., 2014). En revanche, chez le panais qui produit les deux formes de furocoumarines, deux UDT ont été clonées, l'une orientant majoritairement la voie vers les formes linéaires (prénylation essentiellement en C6), l'autre vers les formes angulaires (prénylation majoritaire en C8, Munakata et al., 2016). Enfin, une nouvelle famille de P450, CYP71AZ, a été identifiée chez les Apiacées. Dans cette famille, CYP71AZ4 catalyse l'hydroxylation du psoralène en xanthotoxol, alors que CYP71AZ1 et CYP71AZ6 hydroxylent la xanthotoxine en position 5 (Fig. 3). Une activité similaire a également été démontrée pour CYP82D64 chez les agrumes (Dugrand-Judek, 2015).

Ces travaux ont considérablement fait progresser nos connaissances sur cette voie de biosynthèse. Ainsi, si on dresse un bilan de gènes clonés et identifiés (Fig. 3), on se rend compte qu'à l'exception d'une étape, il est possible de recréer la voie de biosynthèse menant jusqu'à la furocoumarine linéaire xanthotoxol à partir de *p*-coumaroyl-coA présent dans l'ensemble des plantes. L'étape manquante correspond à la marmésine synthase catalysant la cyclisation du cycle furane à partir de la déméthylsuberosine. Depuis 2015, j'ai réintégré la caractérisation de la voie des furocoumarine dans mes activités de recherche, dans le cadre de la co-direction de deux thèses (G. Galati 2015-2019 ; C. Villard 2017-2020) avec pour objectif de cloner et identifier le gène de la marmésine synthase.

3.2.5 A la recherche de la Marmésine synthase

Contributeurs : F. Bourgaud (Pr. LAE), C. Charles (TR LAE), G. Galati (Doct. 2015-2019 ; ATER 2019-2020), A. Hehn (Pr. LAE), T. Kitajima (Pr. U. Kyoto), R. Larbat (CR LAE), S. Legay (Dr. LIST), A. Olry (IR LAE), S. Roselli (P.Doct 2012-2016), E. Schranz (Dr. Wageningen Plant Research), Cloé Villard (Doct. 2017-2020)

3.2.5.1 Choix des plantes modèles

3.2.5.1.1 Le panais

Depuis les travaux que j'ai initiés sur la caractérisation des CYP71AJ, le panais est devenu l'un de nos modèles d'étude de la voie des furocoumarines. A partir de cette plante nous avons pu identifier les deux familles de P450 CYP71AJ et CYP71AZ (Larbat et al., 2007, 2009; Krieger et al., 2018), une prényltransférase (PsPT, Munakata et al., 2016) et une dioxygénase (PsDiox, Roselli et al., 2017) tous impliqués dans la biosynthèse de ces métabolites. Nous avons pu mettre en place sur cette plante des méthodes d'élicitation de la voie des furocoumarines, notamment par pulvérisation des feuilles au méthyl jasmonate et par blessures mécaniques sur les racines. Nous disposons d'une banque RNAseq de feuilles de panais traitées au méthyl-jasmonate. Cette banque a été construite en 2011 avec la technologie 454 (Krieger, 2014). C'est une banque normalisée qui, bien que n'étant pas quantitative, offre l'avantage d'optimiser les chances de retrouver des gènes faiblement exprimés.

Par ailleurs, nous disposons aussi d'une banque BAC (Bacterial Artificial Chromosome) construite par le CNRGV (Centre National de Ressources Génomiques) de Toulouse dans le cadre du post doc de Sandro Roselli (2012-2016) dont l'objectif était de mieux comprendre l'organisation génomique de la voie des furocoumarines. Ces travaux ont permis de montrer la présence de deux clusters de deux gènes (CYP71AJ3/CYP71AJ4 et PsPT/PsDiox) sur deux chromosomes différents (Roselli et al., 2017). La notion de cluster de gènes et la disponibilité de la banque BAC permet de développer une stratégie de recherche de nouveaux candidats à proximité des gènes déjà connus.

La recherche de gènes candidats à partir des ressources disponibles chez le panais a été entreprise dans la cadre de la thèse de G. Galati (2015-2019) par deux approches, l'une dite transcriptomique, basée sur la recherche à partir de banques RNAseq disponibles, l'autre, dite génomique, par recherche de candidats dans la banque de BAC.

3.2.5.1.2 *Ficus carica*

La présence de furocoumarines linéaires et angulaires a été rapportée dans plusieurs genres de la famille des Moracées, comme *Dorstenia*, *Fatoua*, *Brosimum*, *Maquira* ou *Ficus* (Athnasios et al., 1962; Rovinski and Sneden, 1984; Vieira et al., 1999; Abegaz et al., 2004; Chiang et al., 2010; Takahashi et al., 2017). Mais c'est dans le genre *Ficus* et en particulier chez *Ficus carica*, le figuier, que les études ont été les plus poussées. *Ficus carica*, accumule dans ses tissus une grande variété de furocoumarines linéaires (psoralène, bergaptène, marmésine, xanthotoxol, xanthotoxine, rutarétine, glucoside d'acide psoralique) et angulaires (angélicine, pimpinelline) (Innocenti et al., 1982; Mamoucha et al., 2016; Marrelli et al., 2012; Takahashi et al., 2014, 2017). La voie de biosynthèse des furocoumarines a été étudiée chez *Ficus carica* par des approches de marquage isotopique, qui confirment les connaissances actuelles, mais suggèrent aussi la présence d'une voie alternative menant à la synthèse de bergaptène

directement à partir de 5-hydroxy-marmésine (Caporale et al., 1970; Dall'Acqua et al., 1979; Caporale et al., 1981b).

L'accumulation de furocoumarines constitue l'un des nombreux mécanismes de défense de *Ficus carica* que nous avons décrits dans un article de revue récent (Villard et al., 2019). Parmi ces moyens de défense, *F. carica* produit un latex collant au contact de l'air afin d'engluer les appareils buccaux des insectes pouvant l'agresser. Ce latex contient également de nombreuses substances chimiques (protéines, métabolites spécialisés) pouvant intoxiquer les agresseurs. Les furocoumarines sont essentiellement présents dans le latex et, de plus, leur concentration dépend du tissu contenant le latex. Ainsi le latex de feuilles est plus riche en furocoumarines que celui d'écorce et de fruits (Kitajima et al., 2018).

Cette accumulation différentielle en furocoumarines corrèle avec le niveau d'expression d'unigènes de *F. carica* présentant une forte homologie avec les gènes contrôlant les premières étapes de la voie des phénylpropanoïdes (Kitajima et al., 2018). Ceci laisse supposer qu'une approche de criblage différentiel entre des latex de feuilles et de fruits pourrait permettre d'identifier des nouveaux gènes candidats dans la voie de biosynthèse.

Dans la cadre d'une collaboration avec le Pr. Sakihito Kitajima de l'Université de Kyoto, nous avons accès aux données de trois banques RNAseq construites à partir de latex de pétiole de feuille, d'écorce et de fruit de *F. carica.* Le travail de criblage de gènes candidats spécifiquement exprimés dans le latex des pétioles de feuille est entrepris dans le cadre de la thèse de C. Villard (2017-2020).

3.2.5.2 Identification de candidats

3.2.5.2.1 Approche transcriptomique

L'approche transcriptomique a été utilisée chez le panais et chez le figuier pour identifier des séquences candidates. La figure 8 résume les différentes étapes réalisées à partir du matériel disponible pour les deux plantes modèles.

Les banques RNAseq sont constituées de fragments de petites tailles. Un premier travail consiste donc à contiguer[2] les différents fragments pour reconstruire des cDNA potentiels. Ce travail est particulièrement laborieux dans le cas du panais dans la mesure où la banque créée avec la technologie 454 est peu profonde[3] et permet de reconstituer que des fragments de 400 pb en moyenne. Dans ce cas, deux étapes de contiguage ont été nécessaires pour obtenir des séquences partielles d'une taille moyenne de 800pb. Dans le cas du figuier, la technologie récente de génération de banque (illumina) et la disponibilité de données génomique sur *Ficus carica* et *Ficus religiosa* a permis d'obtenir des séquences complètes en une seule étape.

L'identification de gènes candidats s'est basée sur différents cribles. Le travail a été entamé en se focalisant sur des gènes de P450 en se basant sur l'hypothèse que l'activité marmésine synthase est catalysée par cette famille d'enzyme chez les Apiacées (Hamerski and Matern, 1988b). Devant l'abondance de séquences de P450 présentes dans les banques RNAseq, nous avons restreint le nombre de sous-familles de P450 à prendre en considération. Ainsi, les sous-familles CYP71, CYP81 et CYP82 ont été ciblées dans un premier temps. Nous avons fait ce

[2] Action d'assembler plusieurs petites séquences (« reads ») présentant un chevauchement partiel pour obtenir une séquence plus longue, idéalement une séquence codante entière.
[3] La profondeur d'une banque RNAseq indique le nombre de reads générés.

choix car (i) nous avons déjà démontré le rôle des CYP71 dans la biosynthèse des furocoumarines, (ii) Les enzymes de la famille CYP81 sont généralement impliqués dans des mécanismes de réponse aux stress biotiques dont la synthèse de métabolites spécialisés (Liu et al., 2003; El-Awaad et al., 2016; Ono et al., 2018), (iii) certains CYP82, comme le CYP82C2 et CYP82C4 issus de Arabidopsis ont la capacité de métaboliser des furocoumarines bien que ça ne soit pas leur substrat naturel (Kruse et al., 2008). A ce premier crible initié sur la banque de panais, nous avons ajouté la famille CYP76 dans le criblage des banques de figuier. Les CYP76 sont impliqués dans la métabolisation de métabolites spécialisés et certains métabolisent des herbicides, démontrant une certaine flexibilité de cette famille (Hoefer et al., 2014).

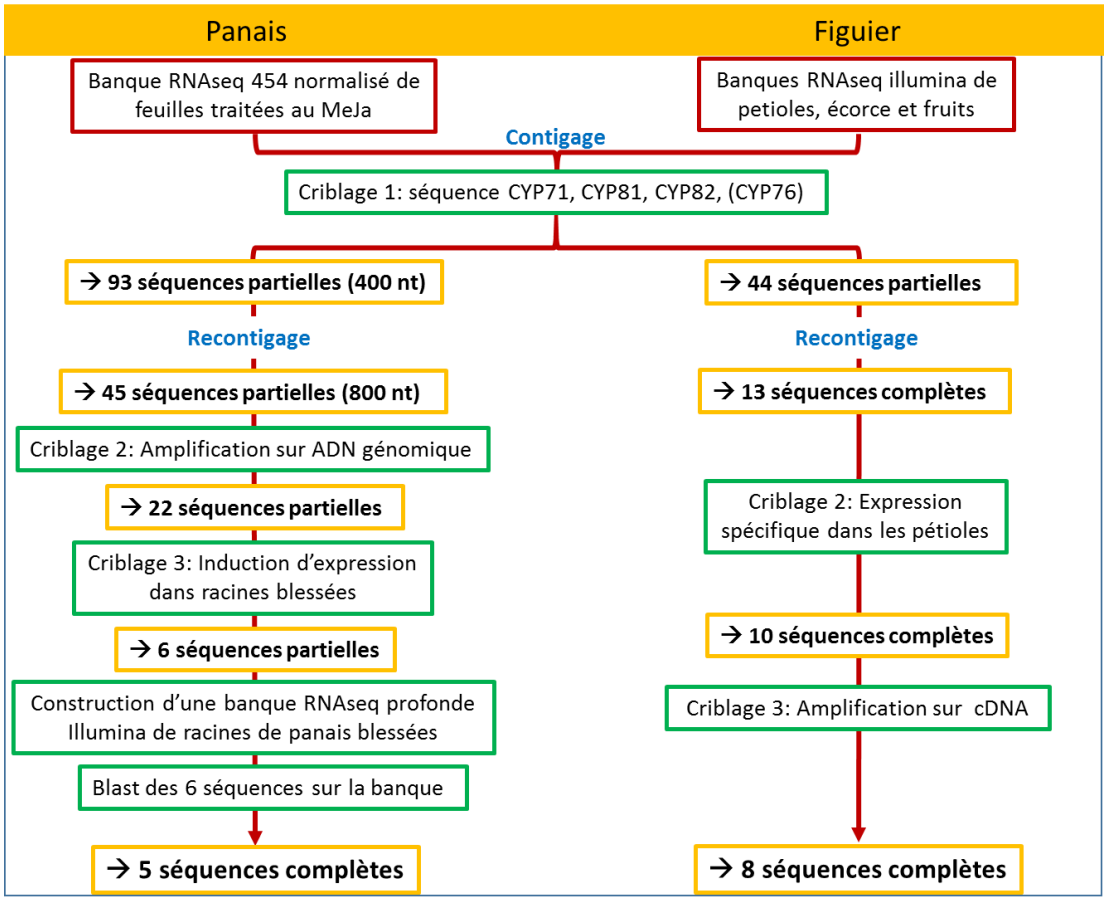


Figure 8 : Schéma récapitulatif des stratégies de recherche de gènes candidats codant l'activité marmésine synthase chez le panais et le figuier par une approche de transcriptomique.
Les cadres verts représentent les différentes actions intermédiaires entreprises pour l'identification de séquences candidates complètes. Les cadres jaunes sont les résultats intermédiaires et finaux de ces actions.

Ce premier crible a permis d'identifier 45 séquences partielles chez le panais et 13 séquences complètes chez le figuier.

Dans le cas des banques de figuier, le second crible a été de sélectionner les candidats sur-représentés dans la banque de latex de pétiole de feuille en comparaison des banques de latex d'écorce et de fruit moins riches en furocoumarines. Ce criblage a permis de restreindre le nombre de séquences candidates à 10. La séquence des contigs a ensuite été confirmée par amplification des séquences à partir du cDNA pour 8 d'entre elles.

Dans le cas du panais, il a été nécessaire de confirmer l'existence des contigs en les amplifiant à partir d'ADN génomique. Seules 22 séquences sur les 45 ont été amplifiées. Le niveau d'expression de ces 22 séquences a été comparé par PCR quantitative sur des cDNA de

racines blessées et de racines intactes indiquant que 6 d'entre elles ont un niveau d'expression augmenté dans les racines blessées de façon comparables aux gènes de la voie des furocoumarines déjà identifiés (CYP71AJ3 et 4). L'obtention des séquences complètes de ces 6 candidats était impossible avec le matériel disponible. Nous avons choisi de créer une banque RNAseq issue de racines blessées de panais. Cette banque profonde, créé dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Sylvain Legay (LIST, Luxembourg) permet d'avoir accès à l'ensemble des gènes exprimés dans les racines suite à la blessure mécanique. Les 6 séquences candidates partielles ont été recherchées contre cette nouvelle banque RNAseq. Par cette méthode, nous avons pu obtenir 5 séquences complètes.

3.2.5.2.2 Approche génomique

L'approche génomique a consisté, à partir de la banque de BAC, à rechercher des séquences de P450 à proximité des deux clusters initialement identifiés. Le séquençage des deux BAC portant les deux clusters (*CYP71AJ3*/*CYP71AJ4* et *PsPT1*/*PsDiox*) a révélé la présence de 5 séquences de P450 au voisinage des clusters (Fig. 9). Quatre appartiennent à la famille *CYP72A* et un à *CYP71AT*. Les *CYP72A* se retrouvent répartis à proximité du cluster *CYP71AJ3*/*CYP71AJ4*. Sur les quatre CYP72A, deux apparaissent comme des pseudogènes. *CYP71AT* est distant de seulement 800pb de *PsDiox*. Au final, cette approche génomique a permis d'identifier 3 nouveaux P450 candidats.

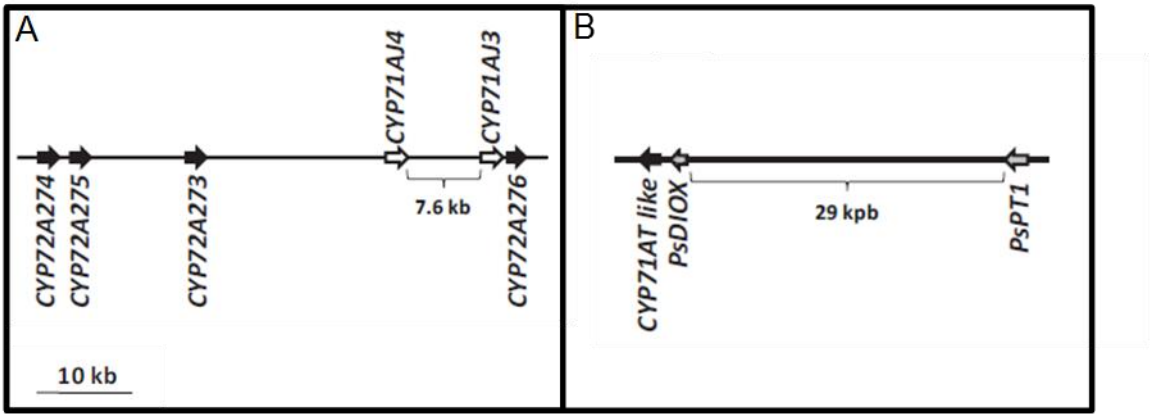


Figure 9 : Représentation schématique des deux clusters de gènes impliqués dans la voie des furocoumarines chez le panais.

A- Cluster1 : Les deux gènes de fonction connue CYP71AJ3 *et* CYP71AJ4 *sont représentés en blanc. Quatre P450 de la famille CYP72A (flèches noires) sont présents à proximité de ce cluster. B- Cluster 2 : Les deux gènes de fonction connue sont représentés en gris. Un gène de la famille CYP71AT est présent à proximité de ce cluster. Issue de Roselli et al. (2017).*

3.2.5.3 Criblage fonctionnel in vitro

Au bilan, la combinaison des approches transcriptomique et génomique a permis d'identifier 8 gènes candidats chez le panais et 8 chez le figuier.

Les étapes suivantes ont consisté à cloner les séquences codantes à partir de cDNA de panais et de figuier, puis sous-cloner ces séquences dans le vecteur d'expression pYeDP60 en vue de la production des enzymes dans les levures WAT11.

Chez le panais, 4 séquences sur les 7 candidats ont pu être clonées et introduites dans les levures. Il s'agit de deux CYP72A et de CYP71AT identifiés par l'approche génomique et un

CYP71 identifié par l'approche transcriptomique. Le criblage métabolique réalisé sur ces 4 candidats n'a cependant pas permis de révéler une activité enzymatique en lien avec la voie des furocoumarines.

Chez le figuier, les 8 candidats ont été exprimés chez la levure. Le criblage fonctionnel, en cours, a d'ores et déjà permis d'identifier un P450 catalysant la formation de marmésine à partir de la déméthylsubérosine, validant ainsi l'objectif initial d'identifier un gène codant pour la marmésine synthase. La caractérisation enzymatique de ce P450, en cours, indique une très forte affinité pour le substrat.

3.3 Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre illustrent la difficulté de l'identification des gènes contrôlant une voie de biosynthèse de métabolites spécialisés. Cependant, le niveau de compréhension de la voie de biosynthèse des furocoumarines s'est considérablement amélioré en 16 ans avec l'identification fonctionnelle de 12 gènes, issue en grande partie des travaux de notre équipe et de ses collaborateurs majeurs (Univ. Marburg, Univ. Kyoto, Univ. Kobe).

D'un point de vue personnel, la caractérisation de cette voie de biosynthèse constitue un fil rouge dans ma carrière. J'ai abordé cette thématique dès ma thèse au cours de laquelle j'ai caractérisé la fonction d'un premier P450 dans cette voie (CYP71AJ1_Psoralène synthase). Lors d'un cours postdoc à la suite de ma thèse, j'ai cloné et caractérisé la fonction de 3 nouveaux P450 de la famille CYP71AJ chez des Apiacées, confirmant la fonction Psoralène synthase pour deux d'entre eux (CYP71AJ2 et 3) et identifiant ce qui demeure encore le seul P450 impliqué dans la voie des furocoumarines angulaires (CYP71AJ4_Angélicine synthase). Mon travail a également eu des conséquences majeures sur l'évolution de la thématique dans l'équipe : Une banque de cDNA de feuilles de *Ruta graveolens* que j'avais construite en cours de thèse sans en tirer bénéfice, a permis l'identification de la dioxygénase C2'H impliquée dans une première étape de la voie des furocoumarines. Par ailleurs, au travers du clonage et de l'identification de CYP71AJ4, mon travail de postdoc, a fait entrer le panais comme modèle d'étude de la voie des furocoumarines au laboratoire (à l'origine de 6 publications). Depuis 2015, mon implication sur cette thématique s'opère par mon activité de co-direction de thèses où j'essaie de transmettre mon expérience acquise sur cette thématique (biologie et physiologie moléculaires, modélisation structurale) enrichie de compétences que je développe sur la thématique de la régulation du métabolisme spécialisé par l'environnement de la plante (écophysiologie, métabolomique).

Avec le clonage récent de la marmésine synthase, nous disposons de l'ensemble des gènes, issus d'espèces différentes, mais métabolisant les étapes successives de la voie de biosynthèse des furocoumarines linéaires. Ces données moléculaires permettent d'aborder des questions passionnantes sur l'apparition et l'évolution de cette voie de biosynthèse au sein du règne végétal. Il est admis que la synthèse de furocoumarines fournit un avantage adaptatif vis-à-vis de contraintes biotiques (Berenbaum and Feeny, 1981). La distribution des furocoumarines dans le règne végétal ne semble pas restreinte à des familles phylogénétiquement proches (Munakata et al., 2019). L'analyse phylogénétique des prényltransférases de figue et de panais suggèrent qu'elles dérivent d'ancêtres différents ce qui constitue un argument fort en faveur de l'hypothèse d'une apparition indépendante de la voie des furocoumarines chez différentes espèces par un processus de convergence évolutive (Munakata et al., 2019). Cette analyse

devra être réalisée sur d'autres étapes de la voie, en amont et en aval de l'étape prényltransférase. C'est déjà possible, en amont dans le cas des dioxygénases qui ont été clonées chez une Rutacée (*Ruta graveolens*), une Apiacée (panais) et une convolvulacée (patate douce). En revanche, en aval nous ne disposons pour l'heure que d'un gène issu d'une seule famille botanique.

L'étude de la voie des furocoumarines angulaires pose également une question évolutive. Comme mentionné dans ce chapitre, l'hypothèse dominante est que cette voie est apparue après et à partir des formes linéaires. Les travaux que j'ai initié sur CYP71AJ3 et CYP71AJ4 et qui ont été poursuivis lors du Postdoc de S. Roselli, vont dans ce sens et suggèrent que le gène codant l'angélicine synthase (*CYP71AJ4*) est issu d'un événement de duplication-néofonctionalisation à partir de *CYP71AJ3*. Néanmoins les données moléculaires manquent encore sur cette partie de la voie pour confirmer cette hypothèse sur d'autres étapes enzymatiques.

Avec les travaux en cours, nous disposons de l'ensemble des étapes enzymatiques conduisant à des furocoumarines majeures et spécifiques de certaines plantes (psoralène, xanthotoxol) à partir de la phénylalanine, un acide aminés présent chez tous les organismes. Nous sommes maintenant en capacité de développer une approche d'ingénierie métabolique pour produire ces métabolites dans des organismes incapables de les produire naturellement. Dans quel but ?

1-Produire ces molécules à forte activité biologique. Le psoralène a longtemps été utilisé en médecine pour le traitement du psoriasis et du vitiligo (P-UVA thérapie), mais il est maintenant délaissé en raison de ses effets secondaires (brûlures, risque de cancer de la peau). Son utilisation pour d'autres applications, requérant des doses plus faibles, fait cependant l'objet de travaux récents (Guitart, 2019; Vieyra-Garcia et al., 2019). Dans la perspective d'une nouvelle utilisation en médecine, une production efficace de psoralène dans des microorganismes pourrait être envisagée comme alternative d'approvisionnement.

2- Utiliser ces connaissances pour avancer sur la question des coûts-bénéfices de la défense des plantes. La production de furocoumarines dans des plantes ne les produisant pas naturellement peut en effet constituer un modèle original de l'étude du compromis croissance/défense chez les plantes, concept qui sera abordé dans la partie suivante. Des travaux préliminaires consistant à implanter les deux premières étapes de la voie de biosynthèse des furocoumarines chez la tomate et le tabac ont été engagés dans le cadre de la thèse et de l'ATER de Gianni Galati et sont poursuivis durant celle de Cloé Villard. Ce projet émergent sera décrit plus en détails dans la partie projet.

Publications

Galati, G., Gandin, A., Jolivet, Y., Larbat, R., Hehn, A. (2019) Untargeted metabolomics approach reveals diverse responses of *Pastinaca sativa* to ozone and wounding stresses. *Metabolites*, 9, 153. doi:10.3390/metabo9070153

Villard, C., Larbat, R., Munakata, R., and Hehn, A. (2019). Defence mechanisms of Ficus: pyramiding strategies to cope with pests and pathogens. *Planta*, 249, 617-633.

Höfer, R., Boachon, B., Renault, H., Gavira, C., Miesch, L., Iglesias, J., Ginglinger, J. F., Allouche, L., Miesch, M., Grec, S., Larbat, R., Werck-Reichhart, D. (2014). Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from Arabidopsis thaliana in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant Physiology, 166* (3), 1149-1161.

Vialart, G., Hehn, A., Olry, A., Ito, K., Krieger, C., Larbat, R**.,** Paris, C., Shimizu, B.-I., Sugimoto, Y., Mizutani, M., Bourgaud, F. (2012). . A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from Ruta graveolens L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *Plant Journal, 70* (3), 460-470.

Larbat R., Hehn A., Hans J., Schneider S., Jugdé H., Schneider B., Matern U. et Bourgaud F. (2009) Isolation and functional characterization of CYP71AJ4 encoding the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis. JBC, 284: 4776-4785

Larbat R., Kellner S., Specker S., Hehn A., Gontier E., Bourgaud F. et Matern U. (2007) Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monoxygenase of furanocoumarin biosynthesis. JBC, 282 (1) : 542-554.

Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E. et Matern U. (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Phytochem. Rev. 5: 293-308.

Chapitre d'ouvrage

Munakata, R., Larbat, R., Duriot, L., Olry, A., Gavira, C., Mignard, B., Hehn, A., Bourgaud, F. (2019) Polyphenols from plant roots: an expanding biological frontier. In Recent Advances in Polyphenol Research. Ed. Wiley.

Rapport

Projet Soutien Région Grand Est. Rapport final Etude de la voie de biosynthèse et du rôle physiologique de la caféoylputrescine chez la tomate.

Thèses

Gianni Galati (2015-2019). Edition de la voie de synthèse des furocoumarines : approches d'ingénierie métabolique pour générer des mutants surproduteurs de furocoumarines et analyse des conséquences de la synthèse de ces molécules sur la physiologie de ces plantes

Cloé Villard (2017-2020). Etude du coût et des bénéfices de l'implémentation de la voie de biosynthèse des furocoumarines chez le tabac et la tomate.

4 Etude de la régulation du métabolisme spécialisé des plantes par leur environnement biotique et abiotique

4.1 Introduction

4.1.1 La vie d'une plante, une question de compromis

La durée de vie d'une plante peut varier de quelques jours à plusieurs centaines d'années en fonction des espèces. Néanmoins la problématique reste toujours la même : pour assurer son succès reproducteur, également appelé fitness, la plante s'appuie sur trois processus : (i) La croissance, qui consiste en la conversion de métabolites primaires en éléments de structure, permet à la plante de « grandir » et de développer des organes (feuilles, racines notamment) pour acquérir des ressources du milieu dans un environnement soumis à la compétition d'autres plantes, (ii) La défense, qui repose notamment sur le métabolisme spécialisé, permet à la plante de se défendre et de résister à l'agression de pathogènes ou d'herbivores, (iii) la fertilité, qui peut se résumer à la production de graines nombreuses et viables, assure la transmission du patrimoine génétique à la génération suivante.

Chacun de ces processus requiert un même pool de ressources, que la plante puise dans son milieu (carbone photosynthétique, eau, éléments minéraux), rendant ainsi ces processus interdépendants, complémentaires et concurrents (Fig. 10). L'optimisation de la fitness d'une plante impose donc l'établissement de compromis dans l'utilisation des ressources pour chaque processus, ce compromis étant amené à varier en fonction des contraintes environnementales.

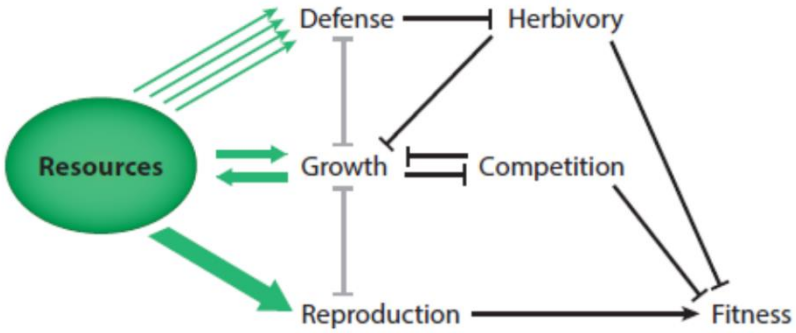


Figure 10 : Diagramme conceptuel de la détermination de la fitness d'une plante médiée par l'effet combiné de la disponibilité en ressources aux processus de défense, croissance et reproduction, de leur compromis et des interactions écologiques.
La taille des flèches vertes représente la part de ressources investie dans chaque processus. L'investissement dans la croissance accroît en retour les capacités d'acquisition de ressources. Une croissance élevée favorise la compétitivité de la plante vis-à-vis de plantes concurrentes pour l'acquisition de ressources. La défense peut être vue comme une multitude de voies drainant chacune une faible part des ressources, mais la combinaison de ces voies peut négativement impacter la croissance. La défense permet d'inhiber ou limiter l'impact délétère d'herbivores ou de pathogènes sur la croissance. Issue de Züst et Agrawal, 2017.

4.1.2 Le compromis croissance/défense

Dans la communauté scientifique, l'étude particulière du compromis entre croissance et défense a suscité et suscite toujours un très fort intérêt (Guo et al., 2018; Herms and Mattson, 1992; Karasov et al., 2017). La croissance des parties végétatives est, en effet, un déterminant

essentiel de l'acquisition de ressources par la plante dont dépendent les autres processus (Fig. 10). En écologie, le compromis croissance/défense est considéré comme un déterminant important de l'évolution des espèces (de Vries et al., 2017, 2019). L'étude du compromis croissance/défense revêt également un intérêt particulier en agronomie. En effet, l'évolution de l'agriculture moderne, principalement basée sur la sélection de variétés à fort rendement s'est accompagnée d'une perte du caractère de résistance, contrebalancée par l'utilisation de produits phytosanitaires. Dans un contexte de forte réduction de l'usage de produits phytosanitaires, une meilleure compréhension des déterminismes et des facteurs de variations du compromis croissance/défense doit pouvoir fournir de nouveaux leviers pour favoriser la protection des cultures tout en impactant peu les rendements.

L'étude du compromis croissance/défense est complexe car il peut être abordé à différentes échelles, impliquant ainsi des mesures de traits différents. Selon Züst et Agrawal (2017), le coût de la défense, qui est la conséquence directe du compromis croissance/défense, peut se définir :

(i) en coût génétique, à l'échelle d'une population, qui peut parfaitement s'illustrer par le processus de sélection variétale favorisant la croissance et le rendement tout en contre-sélectionnant les capacités de défense,

(ii) en coût d'allocation, à l'échelle de l'individu, correspondant à la réduction de croissance liée à l'induction de mécanismes de défense,

(iii) en coût métabolique, à l'échelle du métabolisme, correspondant à l'énergie et à la quantité d'éléments investis dans une voie métabolique particulière,

(iv) en coût écologique, à l'échelle d'un réseau trophique, en déterminant par exemple les conséquences de l'acquisition d'une résistance à un agresseur spécifique sur d'autres agresseurs ou sur des auxiliaires de culture.

Chaque aspect a fait l'objet d'études plus ou moins poussées. Le coût métabolique de l'activation de certains traits de défense peut s'avérer important. Ainsi, à partir de concepts théoriques de physiologie et de biochimie, Gershenzon conclut que la voie de biosynthèse des terpènes est probablement la plus coûteuse en énergie (Gershenzon, 1994). Par ailleurs, l'accumulation de glucosinolates, composés de défense majeurs des Brassicacées, conduit à une augmentation de 15% de l'activité photosynthétique chez *Arabidopsis thaliana* (Bekaert et al., 2012) et l'induction de l'accumulation de furocoumarines par blessure sur des feuilles de panais représente un coût énergétique calculé de 12,6 µg de glucose.cm^{-2} (Zangerl et al., 1997). Enfin, des mutants KO d'*Arabidopsis thaliana* affectés pour l'accumulation de glucosinolates ou de la camalexine présentent une augmentation du taux relatif de croissance, plus marquée aux stades de développement précoces. Cette augmentation s'accompagne d'un fleurissement plus précoce, mais aussi d'une susceptibilité plus forte aux pucerons (Züst et al., 2011).

De nombreux travaux se sont intéressés à l'impact de la disponibilité en ressources sur l'équilibre entre croissance et défense. Ces études se sont appuyées sur différentes théories de répartition entre croissance et défense comme la théorie de la défense optimale (McKey, 1974), l'hypothèse du compromis carbone-nutriment (Bryant et al., 1983; Tuomi, 1992), le modèle de compétition protéique (Jones and Hartley, 1999) ou bien encore l'hypothèse de la balance croissance différentiation (growth differenciation balance hypothesis, GDBH)

considérée comme l'hypothèse la plus aboutie (Herms and Mattson, 1992; Loomis, 1932; Stamp, 2003, 2004).

4.1.3 La GDBH, un cadre conceptuel pour étudier l'impact de la disponibilité en ressources sur l'équilibre croissance défense.

L'hypothèse GDBH a été émise par Loomis en 1932 et revisitée par Herms et Matsson (1992). Selon cette hypothèse, l'intensité des processus liés à la croissance et à la défense est modulée par la disponibilité en ressources. Cette hypothèse, illustrée en figure 11, postule que la croissance est priorisée sur la défense. Elle distingue trois zones en fonction de la disponibilité en ressource. La zone 1 correspond à une condition de limitation sévère en ressource dans laquelle la photosynthèse, la croissance et la défense sont corrélées à la disponibilité en ressource. Dans la zone 2, la photosynthèse (*i.e* l'acquisition de carbone) est optimale, mais la disponibilité en ressources est limitante pour la croissance, menant à une réallocation du carbone disponible vers la défense. Enfin en zone 3, la disponibilité en ressources est optimale pour la croissance qui draine la majorité du carbone acquis par la photosynthèse, au détriment du processus de défense. Selon cette hypothèse, à l'exception de la lumière, tout facteur influençant l'acquisition de ressources (stress hydrique, température, limitation en nutriment) peut être pris en compte. Parmi ces facteurs, la nutrition azotée a certainement été celui le plus étudié. L'azote est en effet un élément minéral essentiel au fonctionnement de la plante, constituant des acides aminés, protéines, acides nucléiques et de nombreux co-facteurs réactionnels, déterminant important de la croissance et du rendement dans un contexte agronomique. Par ailleurs, d'un point de vue expérimental, la nutrition en azote peut être relativement bien contrôlée, en particulier sur des systèmes de fertilisation en hydroponie. De nombreux travaux portant sur la nutrition azotée ont montré, en accord avec la GDBH, qu'une limitation de l'apport en azote diminue à la fois la croissance des plantes et favorise l'accumulation de composés du métabolisme spécialisé, en particulier les composés phénoliques (Glynn et al., 2007; Hoffland et al., 2000; Le Bot et al., 2009; Nguyen and Niemeyer, 2008; Stout et al., 1998). L'analyse de la littérature révèle également des travaux dont les conclusions ne vont pas dans le sens de la GDBH, en particulier concernant certaines familles de métabolites spécialisés comme les terpènes peu impactés par la nutrition azotée de la plante (Koricheva et al., 1998).

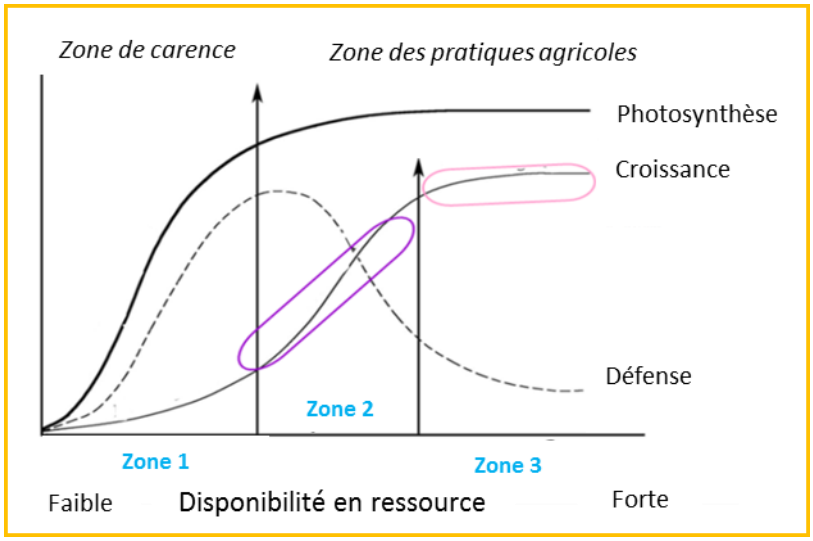


Figure 11 : Représentation schématique de la théorie de la balance croissance défense. Le Bot et al. (2009).

4.1.4 L'étude de l'équilibre croissance défense dans un contexte agronomique : la tomate, un modèle idéal

Comme mentionné précédemment, le contexte agronomique actuel tendant à limiter voire stopper l'utilisation de produits phytopharmaceutiques de synthèse, nécessite de trouver des alternatives pour assurer une bonne protection des cultures tout en maintenant les objectifs de rendement. Dans ce contexte, la recherche agronomique est attendue pour fournir, si ce n'est des solutions, du moins des pistes pour arriver à cet objectif. Ceci passe nécessairement par une meilleure compréhension des systèmes de culture qui peut être considérée à plusieurs niveaux. Un premier niveau concerne le développement d'une agriculture de précision intégrant le développement d'outils adaptés (imagerie, géolocalisation, drones) pour le traitement ou la détection de risque de maladies. Un second niveau concerne l'amélioration du contrôle biologique des cultures par une prise en compte des services écosystémiques fournis par le maintien/l'établissement d'une biodiversité inter et intra-spécifique. Cette approche, dite « top-down », considère le système agricole dans son ensemble (échelle parcelle, paysage) et intègre une meilleure connaissance de l'interaction entre différents niveaux trophiques (communication plante-plante, plante-ravageur, plante-auxiliaire etc…).

La thématique de recherche que je développe depuis mon recrutement en 2007, en forte interaction avec mon collègue C. Robin, constitue un troisième niveau d'étude qui porte sur une meilleure compréhension des mécanismes de défense endogène des plantes en vue de les améliorer par le biais d'une modification des pratiques (approche « bottom-up »).

Pour aborder cette thématique nous utilisons comme modèle le plant de tomate qui revêt un fort intérêt agronomique avec une production annuelle mondiale de 170 millions de tonnes. La culture de tomate est sujette à une forte pression de bioagresseurs divers (http://ephytia.inra.fr/fr/C/4941/Tomate-Index-maladies-et-ravageurs) dont le contrôle repose encore trop sur l'utilisation de pesticides de synthèse. Par ailleurs, la tomate est devenue un modèle d'étude pour lequel de nombreux outils ont été développés. Un génome de référence est disponible depuis 2012 et depuis lors, plusieurs centaines d'accessions ont été re-séquencées, révélant ainsi des millions de SNP (Causse et al., 2013 ; Lin et al., 2014). Par ailleurs, différents outils de biologie moléculaire ont été optimisés sur cette plante comme par exemple les récents outils d'éditions de génome (Brooks et al., 2014).

La défense des plantes se décline en défense constitutive, dans laquelle la plante investit une partie de ses ressources en absence d'agression et qui peut constituer une première barrière (aspécifique) à l'agression, et en défense induite, plus spécifique, que la plante met en place suite à l'agression. Mes travaux réalisés depuis 2007 se sont d'abord focalisés sur l'impact de la nutrition azotée sur l'équilibre croissance-défense de la tomate, en considérant spécifiquement l'accumulation de défenses constitutives. A partir de 2011, nous avons intégré l'insecte ravageur *Tuta absoluta* dans nos études. Nous avons ainsi évalué, de manière effective, le levier azote comme moyen d'optimiser la protection des plantes tout en étudiant l'impact de ce levier sur l'induction de mécanismes de défense.

4.2 La nutrition azotée comme modulateur de l'équilibre croissance/défense chez la tomate

Contributeurs : S. Adamowicz (CR PSH), A. Fauvet (TR LAE), J. Grosjean (IE LAE), R. Larbat (CR LAE), J. Le Bot (CR PSH), C. Lillo (Pr. U. Stavanger), C. Robin (DR LAE), M. Royer (Doct. LAE 2009-2013), P. Ruoff (Pr. U. Stavanger)

La question de l'utilisation du levier azote (N) comme moyen de moduler la croissance et la défense du plant de tomate a été abordée un peu avant mon arrivée au LAE, dans le cadre de la thèse de C. Bénard en co-encadrement avec l'unité INRA PSH d'Avignon au travers d'une expérimentation visant à élever de jeunes plants de tomate sur 7 niveaux différents de nitrate pendant 21 jours. L'accumulation de biomasse, la concentration en sucres, en acides organiques et en trois composés phénoliques majeurs (acide chlorogénique, rutine, kaempferol rutinoside) ont été mesurés dans les feuilles de ces jeunes plants. Cette expérimentation a permis de montrer que la croissance et l'accumulation des composés phénoliques mesurés suivent la GDBH avec une croissance réduite pour les concentrations en N les plus faibles et inversement pour les composés phénoliques. Cette étude met également en évidence un point d'inflexion ([N] = 0.3mM) en dessous duquel la croissance et l'accumulation en composés phénoliques sont fortement modulées (Le Bot et al., 2009).

4.2.1 Etude fine du levier nutrition azotée : Variabilité génétique, réponses à l'échelle de organe et de la voie métabolique

Contributeurs : S. Adamowicz (CR PSH), A. Fauvet (TR LAE), T. Génard (M2 LAE, 2012), N. Gripon (M2 LAE, 2011), R. Larbat (CR LAE), J. Le Bot (CR PSH), C. Robin (DR LAE), M. Royer (Doct. LAE 2009-2013)

Ma première expérimentation d'envergure post-recrutement avait pour objectif d'affiner l'étude de la réponse du plant de tomate à une limitation de la nutrition azotée, en cherchant à:

1- Identifier une variabilité génétique de la réponse à ce levier,

2- Etudier l'impact de la limitation en N à l'échelle de l'organe,

3- Etudier l'impact de la limitation en N à la fois sur le pool global de composés phénoliques mais aussi sur sa composition.

L'expérimentation, conduite dans les installations de l'unité PSH (Avignon), a consisté à élever de jeunes plants de tomates correspondant à 9 cultivars sur deux niveaux d'azote, l'un décrit comme suffisant pour soutenir une croissance optimale ([N]=7mM, décrit comme modalité HN), l'autre définit pour limiter l'assimilation à seulement un tiers de celle des plants non limités (0.1mM<[N]<0.15mM ; modalité LN). Après 28 jours de culture, les plants ont été récoltés, échantillonnés (feuilles, tiges, racines) puis les paramètres liés à la croissance (accumulation de biomasse, indice plastochrone…) et ceux liés à la défense (composition en concentration en composé phénoliques) ont été mesurés. Sur ce dernier point, j'ai réalisé un travail de caractérisation par spectrométrie de masse des composés phénoliques détectés dans les feuilles, les tiges et les racines des jeunes plants de tomate, aboutissant à l'identification de 50 composés phénoliques pouvant être répartis en quatre sous-familles (Esters d'acides hydroxycinnamiques, flavonoïdes, anthocyanes et phénolamides). Ce développement méthodologique a représenté une avancée analytique importante sur notre thématique puisqu'à partir de là nous sommes passés d'une étude de quelques marqueurs métaboliques à une étude plus intégrative (qui a évolué ensuite vers le développement d'analyses métabolomiques non ciblées).

Les 9 cultivars de l'étude présentent une variabilité dans leur croissance, avec une accumulation de biomasse allant du simple au triple (Fig. 12), et dans leur accumulation en composés phénoliques (Fig. 13). Néanmoins, tous les cultivars répondent de la même façon à une limitation de la nutrition azotée par une diminution de la biomasse de la plante et une accumulation globale du pool de composés phénoliques. A l'échelle de l'organe, sous nutrition LN, les feuilles et les tiges subissent une limitation de croissance alors que les racines ne sont pas affectées (Fig. 13 A, C, E). En revanche, l'accumulation en composés phénoliques est plus importante dans les racines et les feuilles que dans les tiges (Fig. 13 B, D, F).

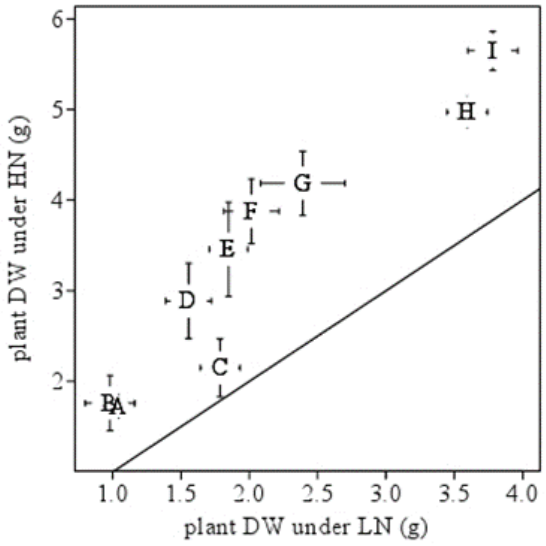


Figure 12 : Répartition de la biomasse sèche des 9 cultivars de tomate sous fertilisation HN et LN.
Les 9 cultivars sont identifiés par une lettre. A: Microtom ; B: Red Robin ; C: Tiny Tim ; D: Florida Basket ; E: Pixie ; F: Totem; G: Husky Cherry Gold; H: Husky Cherry Red; I: Better Bush. La position de chaque lettre correspond à ses coordonnées de masse sèche moyenne sous HN en ordonnées et LN en abscisses. Les barres horizontales et verticales représentent l'erreur standard sous LN et HN respectivement. n=8 pour les cultivars A-F, n=4 pour les cultivars G-I. La ligne continue représente la situation où HN=LN. Ainsi la répartition des points au-dessus de la ligne indique que la biomasse sèche moyenne est supérieure sous HN en comparaison de LN. Issue de Larbat et al. (2012).

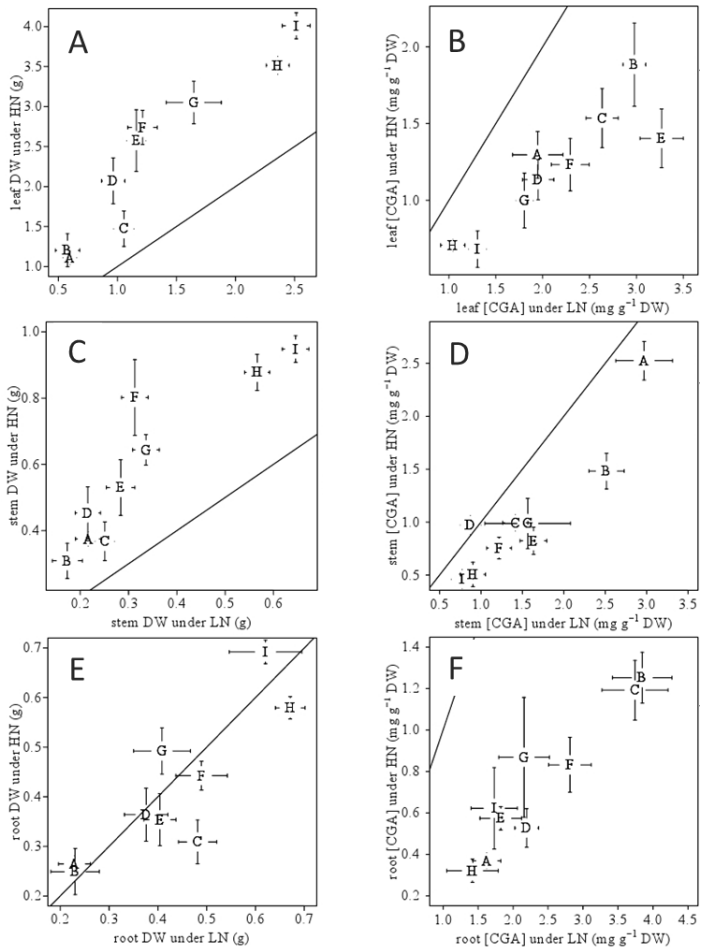


Figure 13 : Répartition de la biomasse sèche et de l'accumulation d'acide chlorogénique (CGA) par organe pour les 9 cultivars de tomate sous fertilisation HN et LN.

La représentation des données suit la description faite en figure 12. A et B représentent les biomasses sèches et les concentrations en CGA dans les feuilles, C et D dans les tiges et E et F dans les racines. Issue de Larbat et al. (2012).

Bien que de manière globale l'évolution des concentrations des composés phénoliques obéisse à la GDBH avec une accumulation plus importante dans les organes des plants LN (facteur moyen de 2, 1.5 et 2.5 dans les feuilles, tiges et racines respectivement), il ressort de ce travail que la sous-famille des phénolamides évolue de manière opposée. C'est le cas de la caféoyl-putrescine retrouvée dans tous les organes ainsi que de la *p*-coumaroyl-tyramine et la féruloyl-tyramine dont les concentrations sont systématiquement plus faibles en condition LN (Fig. 14). Les phénolamides sont issus de la condensation d'un acide hydroxycinnamique sur une polyamine (Fig. 2). Les polyamines sont produites à partir d'acides aminés, l'arginine et la tyrosine dans les cas respectifs de la putrescine et de la tyramine. En se replaçant dans le cadre de la GDBH, ces polyamines, qui contiennent chacune un atome d'azote, pourraient être présentes en plus faible concentration dans les plants LN. Cependant la littérature reste controversée sur l'effet d'une limitation azotée sur l'accumulation en polyamines (Rubio-Wilhelmi et al., 2012; Serapiglia et al., 2008; Sung et al., 1995). L'absence de dosage spécifique de ces composés dans notre étude ne permet pas de conclure si la diminution d'accumulation des phénolamides est la conséquence d'une diminution de la disponibilité en polyamine ou bien la conséquence d'une inhibition spécifique des étapes enzymatiques menant à leur synthèse.

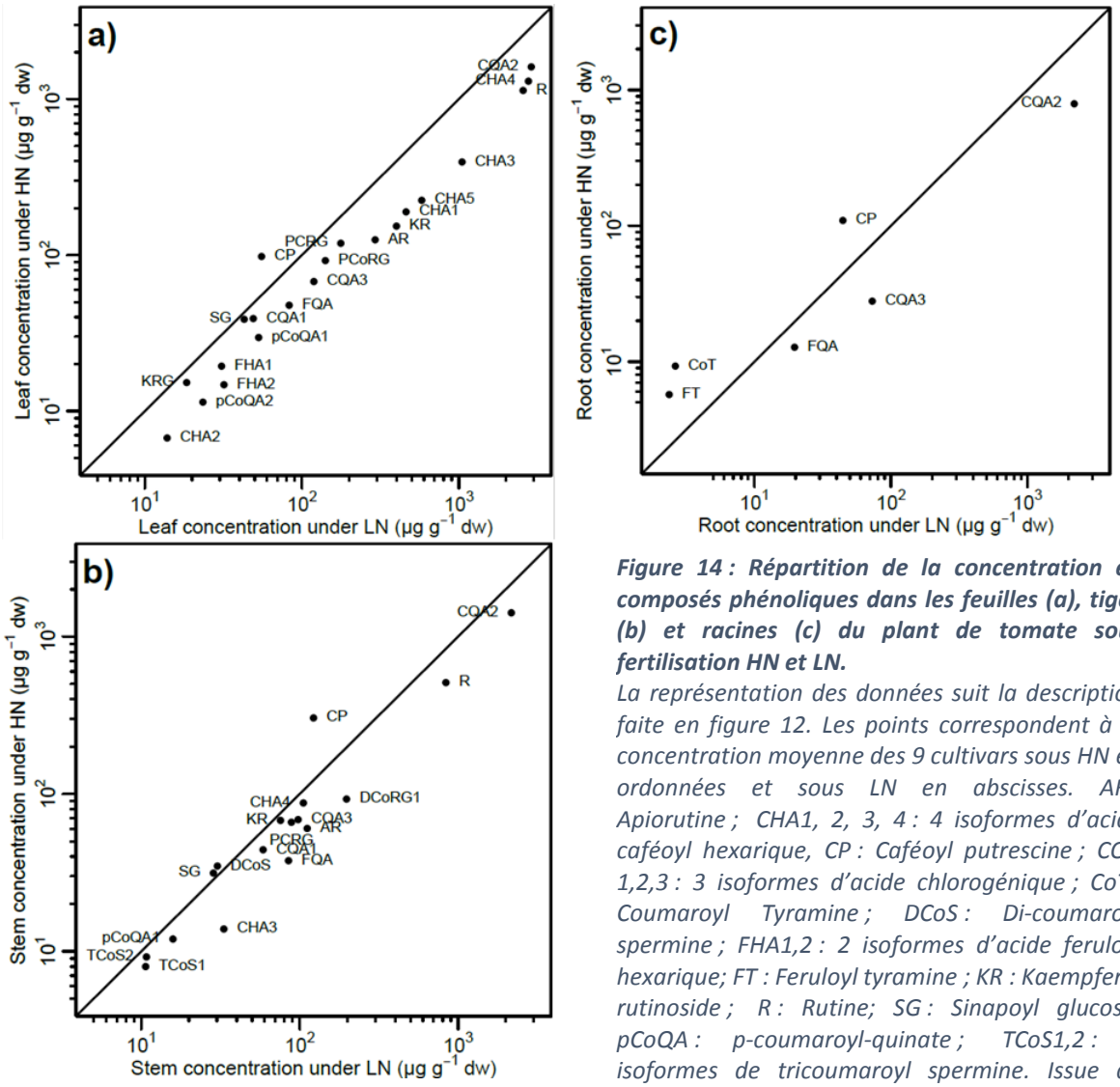


Figure 14 : Répartition de la concentration en composés phénoliques dans les feuilles (a), tiges (b) et racines (c) du plant de tomate sous fertilisation HN et LN.

La représentation des données suit la description faite en figure 12. Les points correspondent à la concentration moyenne des 9 cultivars sous HN en ordonnées et sous LN en abscisses. AR : Apiorutine ; CHA1, 2, 3, 4 : 4 isoformes d'acide caféoyl hexarique, CP : Caféoyl putrescine ; CQA 1,2,3 : 3 isoformes d'acide chlorogénique ; CoT : Coumaroyl Tyramine ; DCoS : Di-coumaroyl spermine ; FHA1,2 : 2 isoformes d'acide feruloyl hexarique; FT : Feruloyl tyramine ; KR : Kaempferol rutinoside ; R : Rutine; SG : Sinapoyl glucose; pCoQA : p-coumaroyl-quinate ; TCoS1,2 : 2 isoformes de tricoumaroyl spermine. Issue de Larbat et al. (2014).

La limitation de la fertilisation en azote conduit par conséquent à une augmentation globale du pool de composés phénoliques, mais cette augmentation s'accompagne d'une modification de sa composition. D'un point de vue du statut de défense de la plante, l'augmentation globale de la concentration en composés phénolique peut être considérée comme bénéfique, d'autant que certains composés comme l'acide chlorogénique, la rutine ou la kaempférol rutinoside possèdent des activités antibactériennes déjà démontrées (Kröner et al., 2012; Leiss et al., 2009; Niggeweg et al., 2004). Cependant, les phénolamides sont également impliqués dans la défense vis-à-vis de pathogènes et de ravageurs (Campos et al., 2014; Onkokesung et al., 2012; Roepenack-Lahaye et al., 2003a; Royer et al., 2016). La diminution de leurs concentrations dans les tissus des plantes élevées avec une fertilisation LN pourrait également modifier leur profil de sensibilité à divers bioagresseurs.

4.2.2 Conceptualisation du levier nutrition azotée : premiers pas vers un modèle de régulation par l'azote de la répartition des flux carbonés entre les métabolismes primaires et spécialisés

Contributeurs : Tormod Drengstig (Dr. U. Stavanger), R. Larbat (CR, LAE), C. Lillo (Pr. U. Stavanger), C. Robin (DR LAE), P. Ruoff (Pr. U. Stavanger)

Après les premières expérimentations qui ont généré un jeu de données volumineux décrivant l'impact de la fertilisation en azote sur la croissance et l'accumulation de composés de défense chez la tomate, j'ai voulu aborder l'étude de ce levier sous un aspect plus mécaniste par une approche de modélisation. L'idée de ce travail a germé suite à la rencontre du Pr. Peter Ruoff à l'occasion de mon séjour sabbatique à l'université de Stavanger en 2010. Le Pr. Ruoff est un spécialiste en modélisation de processus biologiques qui avait récemment travaillé sur la question de l'homéostasie du nitrate cytosolique (Huang et al., 2012). En 2012, j'ai obtenu une bourse (Bourse d'accueil de scientifique du département EA de l'INRA) pour accueillir le Pr. Ruoff au LAE pendant 2 mois. L'objectif de ce séjour était d'initier des chercheurs de l'équipe à la modélisation et de développer un modèle conceptuel permettant d'expliciter la répartition du carbone fixé par la plante entre le métabolisme primaire et le métabolisme spécialisé en fonction de sa nutrition azotée.

L'hypothèse centrale de ce modèle est l'homéostasie de la concentration en saccharose dans les feuilles sous différentes nutritions azotées. En effet, les données expérimentales décrivent toutes un maintien de la concentration en saccharose dans les feuilles de plantes soumises à des nutritions azotées contrastées, alors que les autres sucres (glucose, fructose) et l'amidon s'accumulent plus fortement sous condition de faible apport en azote (Le Bot et al., 2009; Royer et al., 2013, Fritz et al., 2006; Geiger et al., 1999).

Dans ce modèle conceptuel, en nous appuyant sur les données de littérature, nous décrivons les processus de photosynthèse, d'accumulation d'amidon ainsi que certaines régulations médiées par la disponibilité en N comme l'activation de la photosynthèse par induction transcriptionnelle (Vidal and Gutiérrez, 2008) ou la répression de la voie des polyphénols (Fritz et al., 2006). Par ailleurs, nous décrivons l'homéostasie du saccharose sous disponibilité en N contrastée, comme un déterminant de l'aiguillage des flux métaboliques du métabolisme primaire vers le métabolisme spécialisés (limité ici aux composés phénoliques). L'homéostasie du saccharose est contrôlée par trois boucles de rétro-contrôle. La première boucle contrôle la synthèse de saccharose durant le jour à partir du pool de triose phosphate (triose-P), la deuxième, pendant la nuit, à partir de l'amidon. La dernière boucle de rétro-contrôle concerne l'efflux de C à partir du saccharose vers la voie des polyphénols, lorsque la disponibilité en N devient limitante pour le maintien du flux de carbone vers la croissance (Fig. 15).

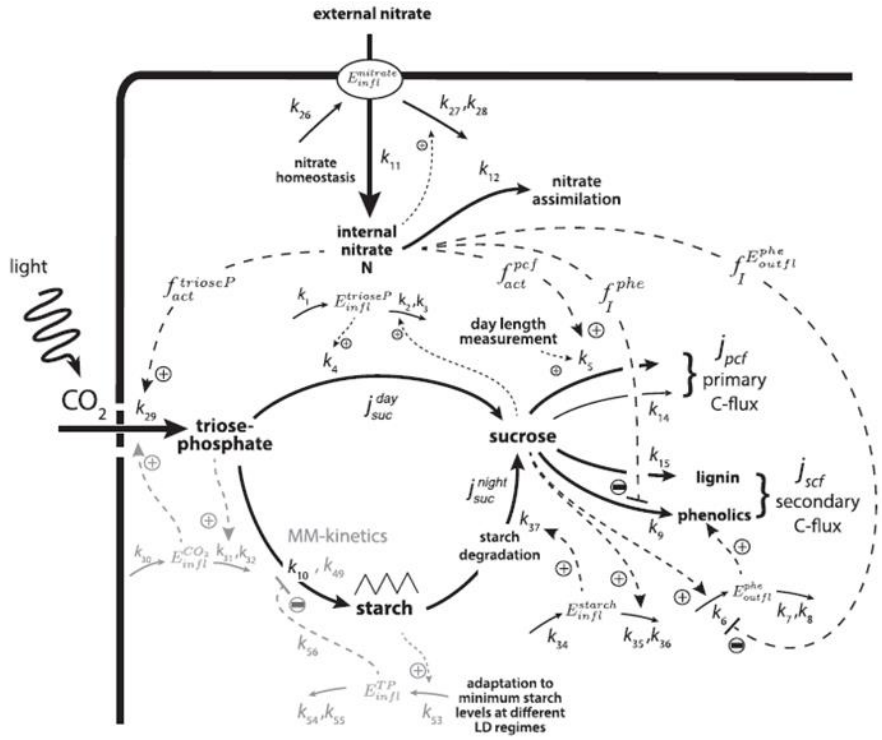


Figure 15 **: *Représentation schématique du modèle de répartition du carbone entre les voies du métabolisme primaire et spécialisé dans la plante en fonction de la disponibilité en nitrate, basé sur le maintien de l'homéostasie du saccharose.***

Durant la phase lumineuse, le pool de triose-P produit par la photosynthèse (k_{29}) est partagé entre la synthèse d'amidon (k_{10}) et de saccharose (J_{Suc}^{day}). Le saccharose est utilisé pour alimenter le flux de carbone vers le métabolisme primaire, la voie de biosynthèse des polyphénols et celle de la lignine. Durant la phase lumineuse, le flux entrant vers le pool de saccharose est contrôlé par une boucle de rétro-contrôle $E_{infl}^{trioseP}$, tandis qu'une autre boucle de rétro-contrôle concerne le flux entrant pendant la phase nocturne à partir de l'amidon E_{infl}^{starch}. Le maintien de la concentration en N intracellulaire est assuré par un mécanisme décrit par Huang et al. (2012). Le niveau de N intracellulaire assure une activation maximale du flux entrant vers le pool de triose-P (k_{29}). Quand la concentration extracellulaire en N devient faible et que les transporteurs à forte affinité ne permettent plus de maintenir la concentration en N intracellulaire, le flux de C vers le métabolisme primaire est diminué en raison d'une plus faible activation de k_5. Dans les conditions où la photosynthèse est moins sensible à une réduction de la disponibilité en N intracellulaire que la croissance (constantes d'activation k_{13} et k_{33} différentes sur f_{act}^{pcf} et $f_{act}^{trioseP}$ respectivement), l'activation par N est maintenue sur la photosynthèse (k_{29}) et le pool de saccharose est encore alimenté. Pour maintenir le niveau de saccharose constant, le C excédentaire est orienté vers la synthèse de composé phénolique par activation de la boucle de rétro-contrôle E_{outfl}^{phe}. Issue de Larbat et al. (2016a).

Nous avons testé le modèle en condition de disponibilité forte ou faible en N (HN ou LN respectivement) sur une période représentant 3 successions nycthémérales (Fig. 16). Dans les deux conditions de disponibilité en N, nous observons une accumulation de triose-P durant la phase lumineuse et un retour à zéro durant la phase nocturne en conséquence de l'arrêt de la photosynthèse (Fig. 16 A, D). Le niveau de saccharose est maintenu en moyenne autour de la valeur arbitraire de 1 durant l'ensemble de la simulation pour les deux régimes N, cependant ce niveau est soumis à une évolution nycthémérale avec un pic lors de la transition jour/nuit et une diminution en fin de nuit (Fig. 16 A, D). Cette évolution nycthémérale de la concentration en saccharose a déjà été rapportée dans la littérature (Lu et al., 2005). Cependant, au vu de leur amplitude, les variations observées ici pourraient être considérée comme des artéfacts dus à la transition jour/nuit abrupte appliquée dans cette simulation. L'évolution de l'amidon décrit un profil en dent de scie caractéristique (Lu et al., 2005)

correspondant à une accumulation durant la phase lumineuse et une dégradation durant la phase nocturne. Alors qu'en condition HN, l'accumulation et la dégradation sont du même ordre, aboutissant à un retour à 0 à chaque succession nycthémérale (Fig. 16 B), en condition LN, nous observons une accumulation plus importante durant la phase lumineuse accompagnée d'une dégradation plus faible durant la nuit. La conséquence est une accumulation d'amidon jours après jours (Fig. 16 E) qui est également observé expérimentalement (Fritz et al., 2006; Le Bot et al., 2009; Royer et al., 2013). Enfin, à l'image des travaux précédemment rapportés, les sorties du modèle concernant les flux de C vers le métabolisme primaire et la voie des polyphénols indiquent une prédominance du premier sur le second en condition sous HN et inversement sous LN (Fig. 16 C, F).

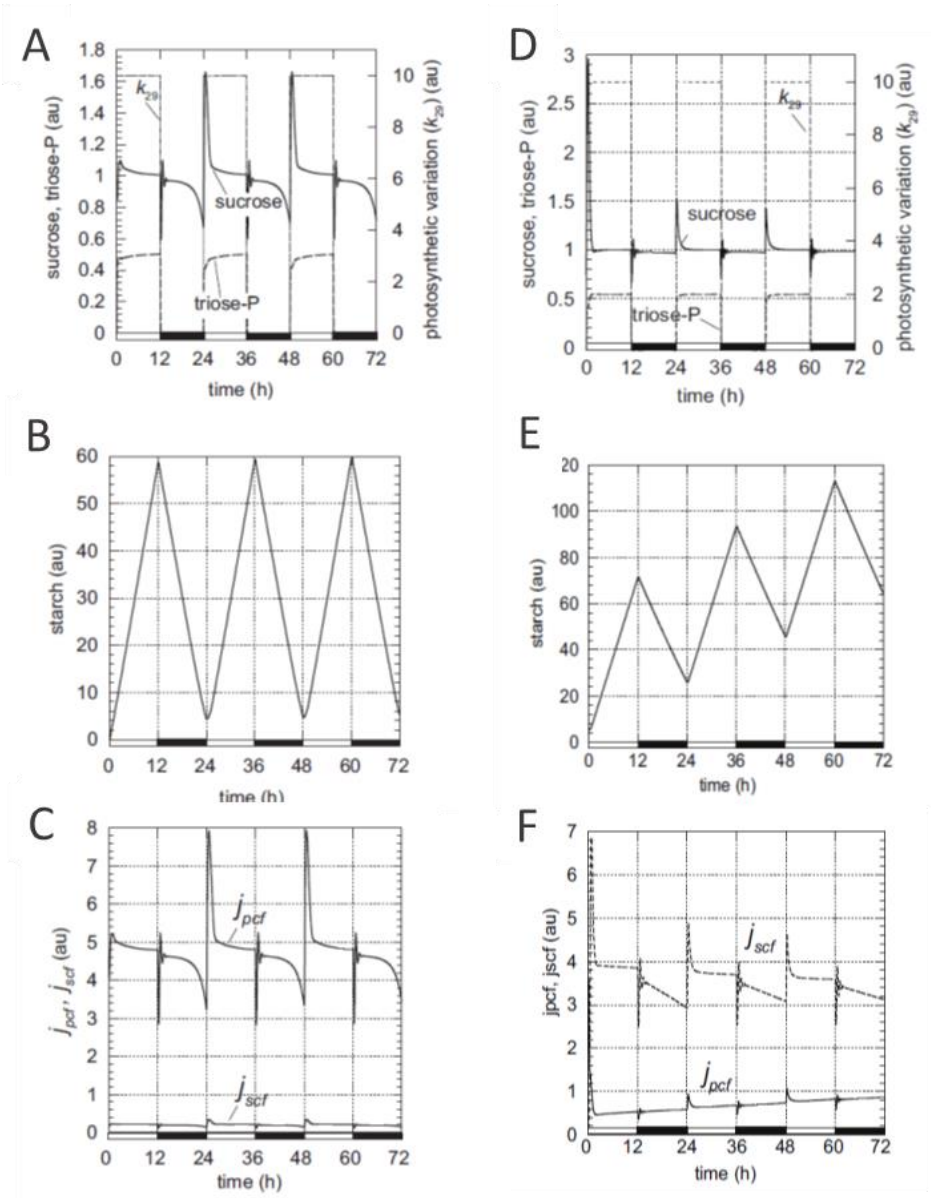


Figure 16 : Prédiction du modèle sur 72h avec une alternance jour/nuit (12h/12h) sous HN (A, B, C) ou LN (D, E, F). *La simulation jour/nuit est effectuée par modification de la constante k_{29} représentant le processus de photosynthèse, dont la valeur est alternativement définie à 10/0. (A, D) Niveau de saccharose et de triose-P ; (B, E) Rythme circadien d'accumulation et de dégradation de l'amidon ; (C, F) Représentation des flux relatifs vers les voies du métabolisme primaire (J_{pcf}) et spécialisé restreint aux polyphénols (J_{scf}). Issue de Larbat et al. (2016a).*

L'adéquation entre les sorties du modèle sous deux niveaux de disponibilité en N et les données expérimentales montrent qu'il est possible de simuler les modifications de flux carbonés vers le métabolisme primaire et la voie des polyphénols en considérant l'hypothèse d'un maintien de l'homéostasie du saccharose. Dans notre modèle, nous avons défini 3 étapes de contrôles de la concentration en saccharose, contrôlant sa synthèse mais aussi sa dégradation. Derrière ces notions théoriques de régulation, nous avons pointé quelques acteurs moléculaires susceptibles de jouer ces rôles de régulateur. Ainsi le régulateur $E_{Inf}^{TrioseP}$ peut correspondre à SnRK1 (Sucrose non fermenting-1-related protein kinase). SnRK1 est activée par le saccharose (Jiang et al., 2013; Tognetti et al., 2013; Wang et al., 2018). Mais SnRK1 inhibe la saccharose phosphate synthase (SPS) impliquée dans la synthèse du saccharose, plaçant ainsi le saccharose et SnRK1 dans une boucle de rétrocontrôle négatif. La kinase TOR (Target Of Rapamycin) a été identifiée comme un régulateur important des voies métaboliques impliquées dans la croissance dans tous les règnes du vivant (Dobrenel et al., 2011, 2016). Chez les animaux et les microorganismes, TOR est inhibé par une faible disponibilité en azote (Rohde et al., 2001). La forte conservation de TOR inter-règne laisse supposer qu'une régulation de ce type existe aussi dans les plantes bien que la démonstration n'est pas été faite. Sous faible disponibilité en N, le maintien de la concentration en saccharose est assuré à la fois par une allocation plus importante du carbone photosynthétique vers le pool d'amidon et aussi par l'activation de la voie de biosynthèse des polyphénols. D'après le modèle, l'activation de cette voie est soumise à un rétro-contrôle médié par le saccharose. Le facteur de transcription PAP1 (Production of Anthocyanin Pigment 1) représente un acteur potentiel de cette boucle de rétro-contrôle. PAP1 est induit par le saccharose (Solfanelli et al., 2006; Teng et al., 2005) et il constitue un complexe avec TT8 (Transparent Testa 8) et TTG1 (Transparent testa Glabra 1) qui active la transcription de l'ensemble des gènes menant à la synthèse de polyphénols.

Ce travail bien que théorique, permet d'aborder la notion de régulation active (au travers de mécanismes de rétro-contrôle notamment) dans l'appréhension de l'hypothèse croissance-défense. Ces conclusions font ainsi écho aux récentes avancées sur la compréhension des mécanismes régissant l'équilibre croissance-défense chez les plantes. En effet, cette thématique a vu un regain d'intérêt ces dernières années, se traduisant par un grand nombre de publications de données expérimentales et de « position papers » apportant un regard nouveau sur la régulation de l'équilibre croissance/défense chez les plantes (Albrecht and Argueso, 2017; Guo et al., 2018; Huot et al., 2014; Karasov et al., 2017; Machado et al., 2017; Züst and Agrawal, 2017). Ces données nouvelles mettent en avant la composante régulation de cet équilibre pondérant de la vision trophique initialement avancée dans les premières hypothèses proposées (GDBH notamment). Cette régulation apparait complexe et fait intervenir un enchevêtrement de voies de signalisation impliquant un ensemble de phytohormones notamment la voie du jasmonate, mais aussi celles des cytokinines, des gibbérellines, de l'acide salicylique, ainsi que le couple de kinases SnRK1/TOR (Margalha et al., 2019).

Au-delà de la description de régulateurs de la balance croissance-défense, plusieurs travaux ont abouti à un découplage de cette balance par modulation de ces voies de régulation, par une approche de génétique ou par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (Campos et al., 2016; Jimenez-Aleman et al., 2017; Smirnova et al., 2017). Le cas de l'étude de mutants affectés à la fois sur la voie de signalisation du jasmonate et de la perception de la lumière chez Arabidopsis (mutant *JazQPhyB*) est particulièrement intéressant et est décrit en détails dans la figure 17 (Campos et al., 2016; Guo et al., 2018).

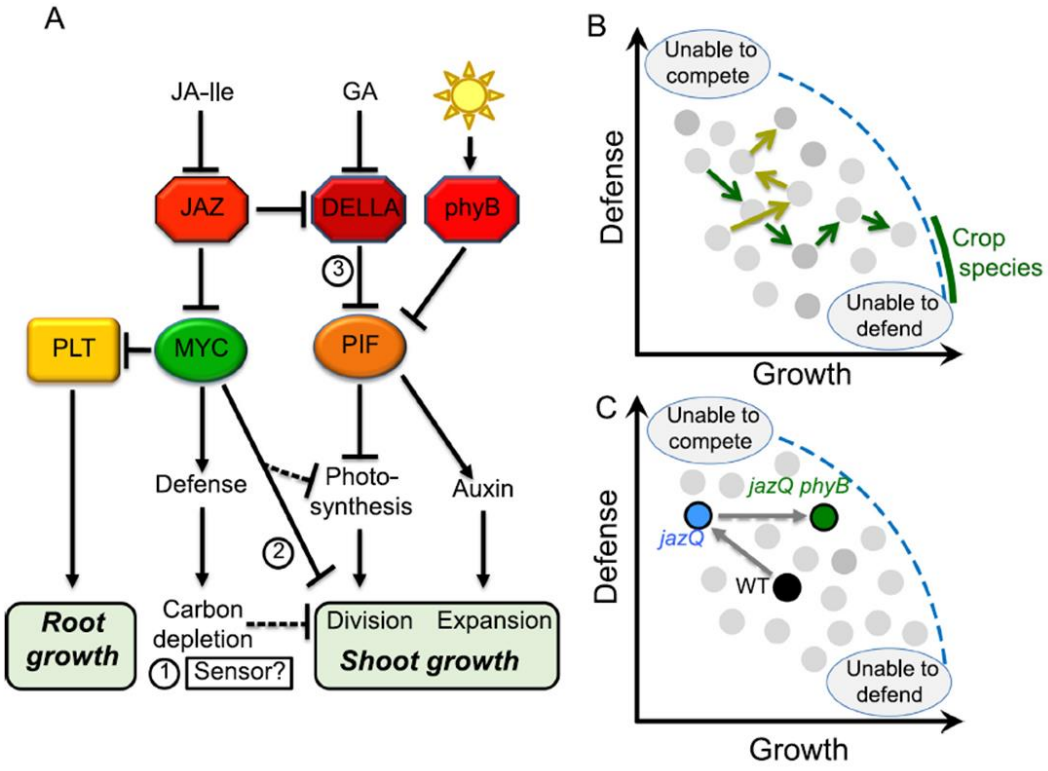


Figure 17 : Exemple d'un réseau de signalisation associé à l'équilibre croissance-défense et conséquence phénotypique de sa modulation.

A- Réseau de signalisation et proposition de mécanismes de régulation de la croissance par le jasmonate impliquant (1) une diminution de la disponibilité en C perçue par un système de détection (SnRK1/TOR ?) adaptant le taux de croissance au C disponible ; (2) une régulation par le facteur de transcription MYC, capable de réduire la croissance racinaire par une inhibition du facteur de transcription PLETHORA (PLT) ; (3) une interaction avec la voie de signalisation des gibbérellines. La dégradation des protéines JAZ (Jasmonate Zim Domain) libère les protéines DELLA qui inhibent le facteur de transcription PIF activateur de la croissance. B- Distribution théorique, en fonction de traits de croissance et de défense, d'individus au sein d'une population. La ligne bleue en pointillés représente la répartition optimale entre croissance et défense dans les limites physiologiques de la plante. Les flèches représentent la trajectoire évolutive menant à une stratégie optimisée d'équilibre croissance/défense par la sélection naturelle (flèches jaunes menant à des individus possédant plus de défense) et par sélection de variétés cultivées (flèches verte menant à des individus avec une forte croissance. C- Illustration de l'évolution d'individus d'Arabidopsis Wild Type (WT) et des mutants JazQ *et* JazQPhyB. *La mutation de 5 recepteur JAZ conduit à des individus* JazQ *accumulant plus de composés de défense et dont la croissance est réduite en comparaison du WT. En revanche, l'addition d'une mutation sur le phytochrome B chez ces individus (*JazQPhyB*) conduit à un maintien des performances défensives et un gain de performance de croissance, générant au final des individus poussant plus vite et accumulant plus de défense que les individus WT. Issue de Guo et al. (2018).*

Ces récents travaux indiquant la possibilité d'un découplage entre les processus de croissance et de défense, offrent une perspective séduisante pour le développement d'idéotypes à fort rendement et plus résistants aux maladies ou bien l'utilisation de molécules capables de stimuler les voies de signalisation spécifiques à la stimulation des défense sans affecter celles réduisant la croissance (Jimenez-Aleman et al., 2017).

A l'échelle de la thématique de recherche que je développe, ces travaux montrent l'importance de prendre en considération le dosage de phytohormones pour avoir une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la modulation de l'équilibre croissance-défense par la disponibilité en azote. La prise en compte des régulations hormonales devra également être faite pour la poursuite du travail de modélisation.

4.2.3 Effet de courtes limitations azotées : un moyen de découpler croissance et défense ?

Contributeurs : A. Fauvet (TR LAE), C. Lillo (Pr. U. Stavanger), R. Larbat (CR, LAE), K. Olsen (IR U. Stavanger), C. Robin (DR LAE), R. Slimestad (Dr. Plant Chem)

Dans le cas de l'utilisation de la fertilisation azotée comme levier de stimulation des défenses de la plante, j'ai émis l'hypothèse qu'un découplage entre croissance et défense pourrait être obtenu par un contrôle temporel des épisodes de limitation en azote afin de permettre à la fois une stimulation des défenses lors des phases de limitation mais également une croissance de la plante lors d'un retour sur une fertilisation azotée non limitante. Cette hypothèse de recherche a constitué le cœur d'un projet de recherche que j'ai soumis en 2010 au ministère norvégien de la recherche afin d'obtenir une bourse de mobilité de 6 mois à l'Université de Stavanger, sous la direction du Professeur Catherine Lillo.

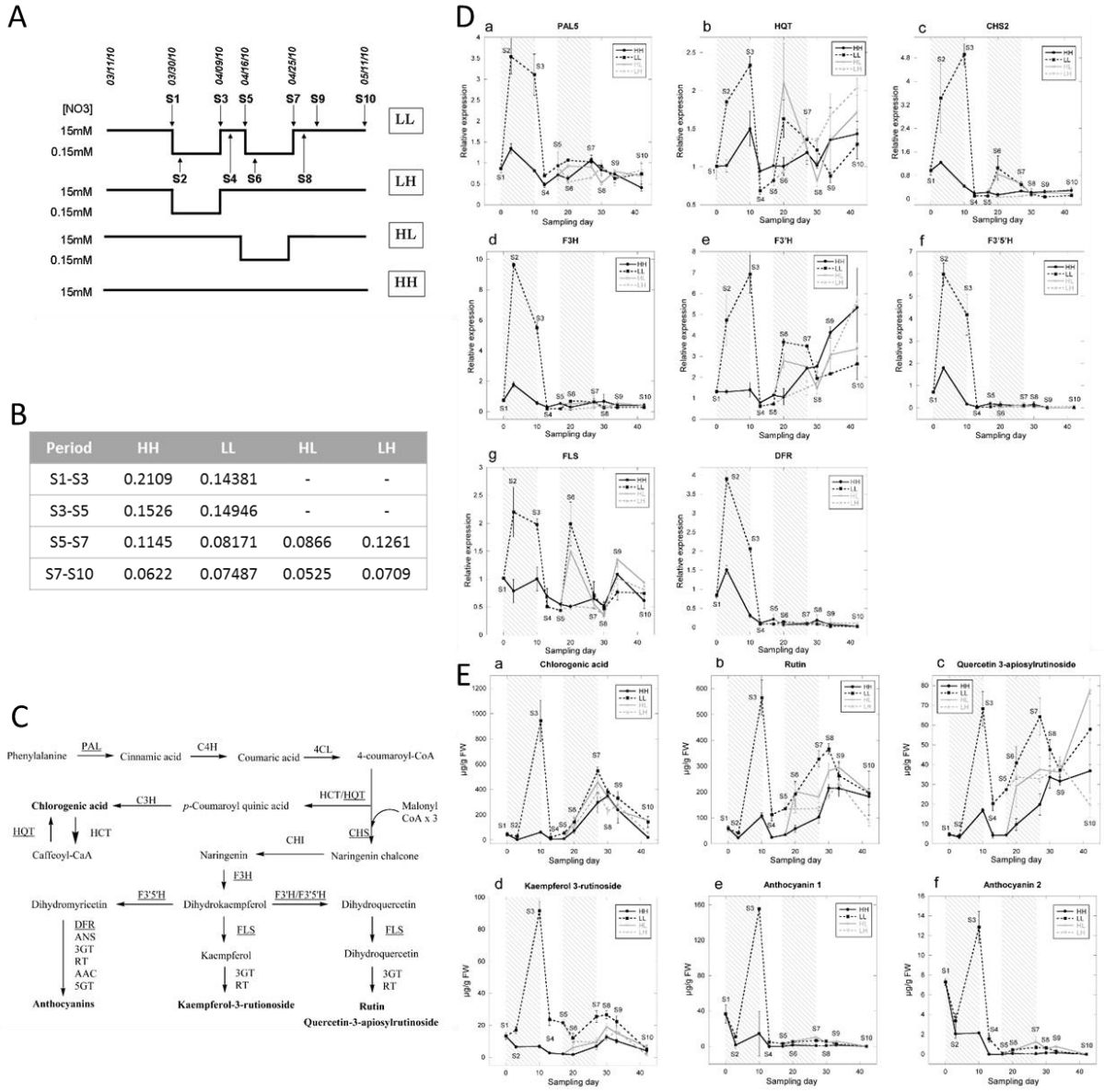
Les questions de recherche auxquelles j'ai tentées de répondre étaient (i) quelles sont les cinétiques des effets d'une limitation de la fertilisation azotée et d'un retour à la normale sur la croissance de la plante et l'accumulation de composés phénoliques ? (ii) la succession d'épisodes de limitation/retour à la normale impacte-t-elle ces effets ?

L'expérimentation a été conduite de mars à mai 2010 dans les serres expérimentales de l'institut norvégien Bioforsk à Saerheim, région de production de tomate sous serre chauffée en Norvège. De jeunes plants de tomate ont été élevés sur pains de laine de roche, la nutrition hydrique et minérale étant assurée par un goutteur. Nous avons soumis les plants à 2 périodes de 10 jours de limitation azotée (LN, 0.15mM) espacées d'une semaine en condition de culture standard (HN, 15mM) (Fig. 18 A). Des conditions témoin, correspondant à une seule période de limitation (la première ou la seconde) ou aucune étaient intégrées au plan d'expérience. Au cours des deux mois de culture, 10 récoltes ont été effectuées. Les biomasses fraiches et sèches ont été choisies comme indicateur de la croissance. Pour déterminer les capacités de défense, l'accumulation de 6 composés phénoliques majeurs (acide chlorogénique, rutine, kaempférol rutinoside, apio-rutine et deux dérivés anthocyanes) a été déterminée dans les feuilles, ainsi que le niveau d'expression de 8 gènes de structures de la voie des polyphénols (Fig. 18 C).

Le calcul du taux relatif de croissance à partir des masses sèches aériennes des plants a permis de montrer que la croissance était diminuée spécifiquement durant les épisodes de limitation azotée mais que cet effet était complètement réversible lors d'un retour à la normale après un ou deux épisodes de limitation azotée (Fig. 18 B).

De manière générale, le même type d'effet « on/off » est observé concernant le niveau d'expression des gènes de la voie des polyphénols. Ainsi, lors du premier épisode de limitation azotée, le niveau d'expression des 8 gènes est augmenté d'un facteur 3 à 10, dès le troisième jour de limitation pour se maintenir jusqu'à la fin de l'épisode (Fig. 18 C, D). En revanche, le niveau d'expression rejoint le niveau des témoins dès 3 jours après le retour à la normale. Un effet similaire est observé lors du deuxième épisode de limitation mais seulement pour 4 gènes. L'accumulation des 6 composés phénoliques mesurés est fortement augmentée lors des épisodes de limitation azotée, cette accumulation atteignant un maximum en fin d'épisode (Fig. 18 E). Lors d'un retour à la normale, la concentration foliaire de tous les métabolites diminue. Cependant on peut distinguer deux cas de figures : (i) La concentration retombe au même niveau que les plantes témoins non soumis aux épisode de limitation comme pour l'acide chlorogénique ou les deux composés anthocyanines, ou (ii) la concentration se

maintient à un niveaux significativement plus élevé que les plantes témoins, comme pour les trois flavonoïdes, rutine, kaempférol rutinoside et apio-rutine. Ainsi, suite au premier épisode de limitation la concentration foliaire en ces 3 flavonoïdes est maintenue supérieure au témoin pendant 17 jours. L'application d'un deuxième épisode permet de conclure que (i) l'amplitude de la stimulation du métabolisme des polyphénols n'est pas altérée par la succession des épisodes de limitation et (ii) un effet additif peut être observé concernant l'accumulation de trois flavonoïdes.



Period	HH	LL	HL	LH
S1-S3	0.2109	0.14381	-	-
S3-S5	0.1526	0.14946	-	-
S5-S7	0.1145	0.08171	0.0866	0.1261
S7-S10	0.0622	0.07487	0.0525	0.0709

Figure 18 : Résumé des principaux résultats de l'expérimentation portant sur de courtes limitations en azote*. A- Description des traitements appliqués. Les plants de tomates sont soumis à une fertilisation en azote de 15mM durant l'intégralité de la culture (HH), ou bien sous soumis à 1 (HL ; LH) ou deux limitations (LL) de la fertilisation. Les 10 échantillonnages (S1 à 10) sont répartis afin d'identifier l'effet à court terme et à long terme de chacun des périodes de limitation, seuls ou combinées. B- Impact des traitements sur le taux relatif de croissance mesurés sur différentes périodes de temps. C- Schéma simplifié de la voie de biosynthèse des composés phénoliques indiquant, en gras, les métabolites mesurés et en soulignés, les gènes dont le niveau d'expression est déterminé, dans les feuilles. D- Evolution du niveau d'expression des 8 gènes de structures de la voie des composés phénoliques dans les feuilles de tomate au cours de la culture. E- Evolution de la concentration en composés phénoliques dans les feuilles de tomate au cours de la culture. Issue de Larbat et al. (2012b)*

Parmi les composés phénoliques mesurés, les données de la bibliographie indiquent qu'une augmentation d'un facteur 2 en acide chlorogénique et 4 en rutine suffisent à augmenter la défense vis-à-vis de pathogènes et d'insectes chez la tomate et le tabac respectivement (Misra et al., 2010; Niggeweg et al., 2004). Dans nos conditions, les concentrations en composés phénolique sont augmentées d'un facteur supérieur à 10 en fin d'épisode de limitation et peuvent se maintenir à des niveaux 3 à 4 fois supérieurs aux témoins, ce qui suggère un réel potentiel dans l'optimisation de la défense de ces plantes.

Dans cette expérimentation, nous avons montré par la détermination du taux relatif de croissance que l'effet délétère de la limitation azotée sur la croissance était restreint à la durée de l'épisode de limitation. Néanmoins le retard de croissance pris lors de la limitation n'est pas compensé, ce qui se traduit par des plantes plus petites à l'issue des deux mois de culture. Les conséquences sur la floraison, la mise à fruit et par extension le rendement n'avait pas été évalués lors de cette expérimentation et seront des paramètres importants à prendre en considération avant d'envisager le développement d'itinéraires techniques basés sur des épisodes répétés de limitations azotées.

4.3 Interactions Tomate x nutrition azotée x *Tuta absoluta*

Contributeurs : S. Adamowicz (CR PSH), V. Coqueret (Doct. LAE 2013-2017), N. Desneux (DR ISA), A. Fauvet (TR LAE), Claude Gallois (TR LAE), P. Han (Doct. ISA 2013-2016), C. Hoeffler (M2 LAE, 2012), R. Larbat (CR LAE), A.V. Lavoir (MCF ISA), J. Le Bot (CR PSH), I. Mechai (M2 LAE 2013), C. Robin (DR LAE), M. Royer (Doct. LAE 2009-2013)

L'intégration d'un bioagresseur dans notre modèle d'étude à partir de 2011 a constitué une évolution forte de notre projet d'équipe qui nous permettait d'étudier concrètement les impacts du levier « nutrition azotée » sur la défense du plant de tomate, en considérant à la fois les défenses constitutives et induites. Par ailleurs, *Tuta absoluta* ancrait notre étude dans un contexte agronomique d'actualité, demandeur de solutions pour le contrôle de ce ravageur émergent. La mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (lépidoptère: Gelechiidae), est un ravageur majeur nécessitant souvent des mesures d'urgence phytosanitaire, en particulier sur le continent afro-eurasien depuis son arrivée en Europe à partir de 2006 (Campos et al., 2017). Elle provoque des pertes de rendement drastiques en raison des galeries que forent les larves dans les feuilles et plus occasionnellement dans les fruits. *T. absoluta* a été historiquement soumis à un contrôle chimique depuis les années 70 en Amérique du Sud. Toutefois, cette stratégie a conduit à l'émergence de populations multi-résistantes (Guedes and Picanço, 2012; Roditakis et al., 2018).

L'étude du modèle tomate x N x *Tuta absoluta* a pu être initiée par le biais d'une collaboration étroite avec les unités INRA PSH d'Avignon et ISA de Sophia-Antipolis qui a permis, et permet encore, de développer une étude intégrée basée sur une complémentarité de compétences (nutrition minérale, entomologie, physiologie de l'insecte et de la plante, métabolisme spécialisé).

4.3.1 Impact de la nutrition azotée du plant de tomate sur le développement de *Tuta absoluta*

Contributeurs : S. Adamowicz (CR PSH), V. Coqueret (Doct. 2013-2017), N. Desneux (DR ISA), A. Fauvet (TR LAE), P. Han (Doct. ISA 2013-2016), R. Larbat (CR LAE), A.V. Lavoir (MCF ISA), J. Le Bot (CR PSH), C. Robin (DR LAE)

Tuta absoluta exerce son herbivorie sur les plants de tomate lors de son stade larvaire. Une fois dans la plante, les larves mineuses se nourrissent du mésophylle et se développent jusqu'au stade de pupaison qui est réalisée hors de la plante. L'état physiologique de la plante sur laquelle se nourrit la larve est fortement susceptible d'impacter son développement. La nutrition azotée de la plante est un facteur important jouant sur le développement de nombreux insectes ravageurs, en raison de son impact sur la physiologie de la plante et du besoin des herbivores en N (Cates et al., 1987; Estiarte et al., 1994; Loader and Damman, 1991).

Un premier objectif de notre étude consistait à valider l'impact d'une limitation de la nutrition azotée du plant de tomate sur le développement de *Tuta absoluta*. Nous avons déterminé la proportion d'œuf de *Tuta absoluta* atteignant les stades larve, pupe et adulte en fonction du statut nutritif de la plantes sur laquelle les œufs sont déposés (HN ou LN). Alors qu'environ 70% des œufs atteignent le stade larvaire pour les plantes HN, cette proportion n'est que de 50% pour les œufs déposés sur les plantes LN. Au final seul 30% des œufs déposés sur les plantes LN aboutissent au stade adulte, contre 60% dans le cas des plantes HN (Fig. 19).

Par ailleurs, le poids moyen des pupes obtenues sur les plantes LN est significativement plus faible. Enfin, le temps de développement des œufs jusqu'aux stades pupe et adulte est significativement plus long sur les plantes LN (Fig. 20).

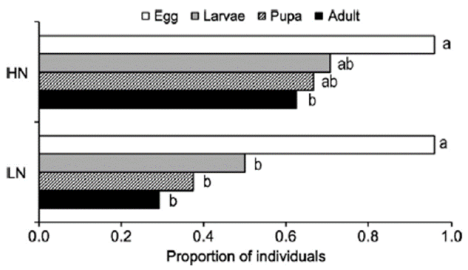


Figure 19 : Proportion des œufs de* Tuta absoluta *atteignant les stades larve, pupe et adulte après dépôt sur des plants HN et LN (n = 24).
Issue de Larbat et al. (2016b)

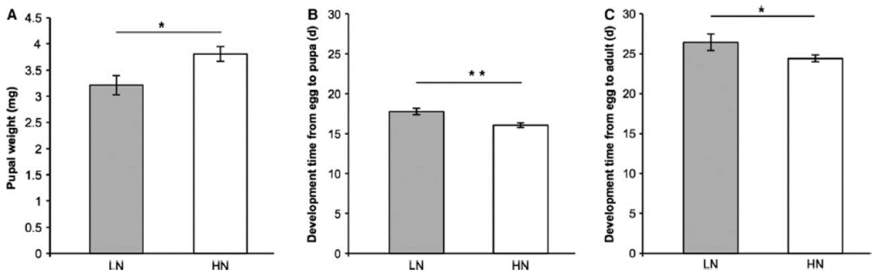


Figure 20 : Impact de la nutrition azotée du plant de tomate sur des traits de développement de Tuta absoluta.
A- Poids moyen de pupe (mg, n=9-16), B, C-Temps de développement de l'œuf à la pupe et de l'œuf à l'adulte (jours, n=7-15). LN : nutrition azotée limitante pour la croissance de la plante, HN : Nutrition azotée non limitante. Issue de Larbat et al. (2016b).

L'ensemble de ces mesures confirme ainsi un effet « bottom-up » de la limitation de la nutrition azotée du plant de tomate sur le développement des larves qui se caractérise par un

taux de survie plus faible (en particulier du stade œuf au stade larve) et des temps de passage d'un stade à l'autre allongés.

Quelles sont les causes de cet effet ?

Nous avons avancé deux hypothèses non exclusives :

1- L'effet « bottom-up » est causé par une altération de la qualité nutritive des tissus des plantes limitées en azote. Nos travaux précédents ont montré que le ratio C/N des tissus est augmenté chez les plantes LN (Royer et al., 2013) en conséquence d'une augmentation des concentrations en métabolites carbonés. D'autres études indiquent une diminution en métabolites azotés en particulier protéines et acides aminés (Fritz et al., 2006; Scheible et al., 2004). L'azote est un élément important pour la physiologie. La concentration tissulaire en N est d'ailleurs plus importante dans les larves que dans les tissus dont elles se nourrissent (Schoonhoven et al., 2005). Une limitation de cet élément chez l'insecte pourrait ainsi impacter sa croissance et son développement.

2- L'effet « bottom-up » est causé par une augmentation de la toxicité des tissus chez les plants LN. Nous avons montré dans la première partie de ce chapitre que la limitation de la nutrition en azote conduit à une augmentation du niveau constitutif de métabolites secondaires (composés phénoliques et tomatine notamment) qui pourraient impacter la physiologie de l'insecte. Par ailleurs, les mécanismes de défense induits par l'herbivorie pourraient être modulés par la disponibilité en azote.

La suite de notre travail a consisté à étudier ces deux hypothèses.

4.3.2 L'effet « bottom up » de la fertilisation azotée sur le développement de *Tuta absoluta* est médié par une composante nutritive

Contributeurs : S. Adamowicz (CR PSH), V. Coqueret (Doct. LAE 2013-2017), N. Desneux (DR ISA), A. Fauvet (TR LAE), R. Larbat (CR LAE), A.V. Lavoir (MCF ISA), J. Le Bot (CR PSH), C. Robin (DR LAE)

Nous avons tenté de valider la première hypothèse par une expérimentation spécifique consistant à infester des plants de tomate élevés sur deux niveaux de fertilisation azotée (HN vs. LN) avec des larves (3ème stade larvaire). Nous avons ensuite suivi l'évolution des galeries creusées, les traits de développement des larves et différents paramètres des feuilles ([N] total, surface, masse sèche et fraiche) à 3 jours et 7 jours après le dépôt des larves.

L'aire des mines creusées augmentent entre le dépôt des larves et la dernière récolte, mais n'est pas significativement différente entre les plantes LN et HN. Les déjections des larves apparaissent comme des taches noires dans les mines translucides (Fig.21 A). Par traitement d'image, nous avons pu mesurer la surface de déjections générées par les larves qui s'avèrent significativement plus importantes sur les plantes LN (Fig. 21 B, C).

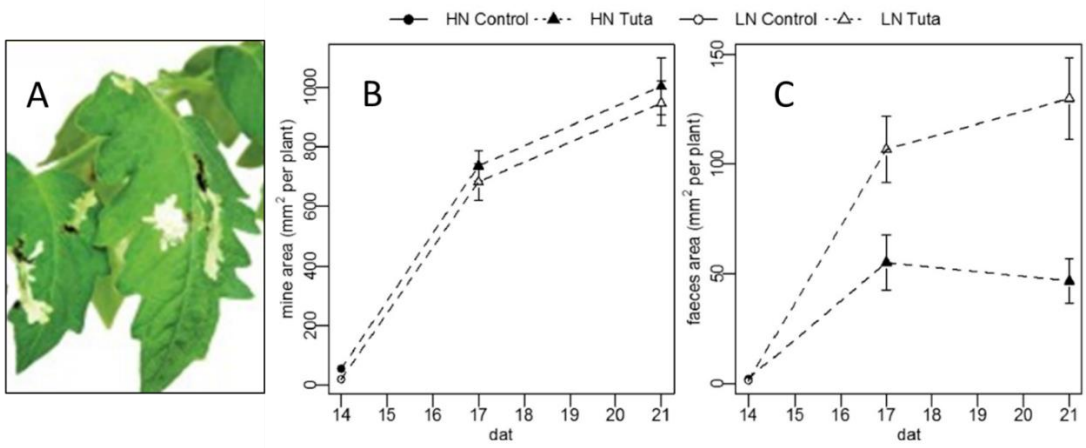


***Figure 21 : Aire des galeries et des déjections générées par les larves de* Tuta absoluta.**
A- Photographie d'une feuille de tomate avec en translucide les galeries et en noir les déjections générées par les larves de Tuta absoluta. *B- Aire de galeries creusées. C- Aire des déjections générées. Issue de Coqueret et al. (2017).*

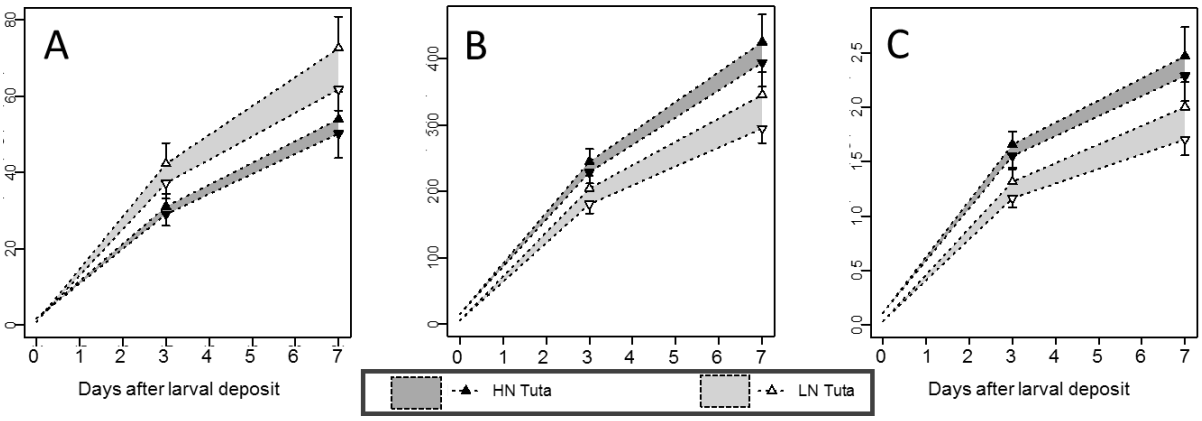


***Figure 22: Estimation de la consommation en matière sèche (A), eau (B) et azote (C) par les larves de* Tuta absoluta *se nourrissant sur tissus HN ou LN*.**
Pour estimer ces consommations, nous avons d'abord calculé trois indicateurs (Specific leaf weight SLW, Equivalent water thickness EWT, Specific Leaf Nitrogen SLN) décrivant la teneur en matière sèche, la teneur en eau et la teneur en N par unité de surface foliaire. Le calcul de ces indicateurs a été fait suivant ces formules : SLW = DW/A; EWT = (FW-DW)/A ; SLN = QN/A , où DW est la masse de matière sèche, QN la quantité d'azote, FW la masse de matière fraiche et A la surface foliaire. Comme il s'agissait de feuilles infestées nous avons fait le calcul en considérant soit A = la surface foliaire totale, soit A= la surface foliaire moins la surface des mines, de façon à donner une estimation avec une fourchette haute et basse. La consommation des larves a ensuite été calculée en multipliant ces estimations par la surface de galerie. Issue de Coqueret et al. (2017).

La mesure des différents traits de la feuille (biomasse sèche et fraiche, teneur en N), ainsi que la surface des galeries générées par les larves nous ont permis de calculer une estimation de la consommation des larves en matière sèche, eau et azote (Fig. 22). Sous LN, les feuilles contiennent significativement moins d'eau et de N et accumulent plus de matière sèche. Dans la mesure où la surface de galeries creusées est similaire entre plantes LN et HN, ceci se traduit par une plus forte ingestion de matière sèche et une plus faible consommation d'eau et d'azote pour les larves se nourrissant sur les plantes LN en comparaison des HN.

L'acquisition de ressources par un herbivore est un processus essentiel et très régulé qui doit lui permettre d'obtenir un niveau cible pour un ensemble de nutriments afin que son développement soit optimal (voir la théorie "geometrical framework", Behmer, 2008). Dans le cas de notre étude, l'augmentation du ratio C/N des feuilles sous LN, induit que, pour

atteindre le niveau cible d'acquisition de N, les larves doivent consommer un excès de C qui doit être éliminé au travers d'une augmentation des déjections. En accord avec la théorie « geometrical framework », ceci se traduit par un coût physiologique dont la réduction de masse des pupes et l'allongement du temps de développement pourraient être une conséquence. Associé à une diminution de l'apport en N, les larves sous LN ingèrent également moins d'eau, ce qui pourrait également impacter la physiologie de l'insecte.

L'ensemble de ces données apportent des éléments en faveur de l'hypothèse selon laquelle le retard de développement observé chez les larves est, au moins en partie, liée à la qualité nutritive de ce qu'elles consomment.

4.3.3 Caractérisation des mécanismes de défense mis en place en réponse à l'herbivorie de *Tuta absoluta* et modulation par la disponibilité en azote

Contributeurs : S. Adamowicz (CR PSH), V. Coqueret (Doct. LAE 2013-2017), A. Fauvet (TR LAE), J. Gershenzon (Pr. MPI Jena), R. Larbat (CR LAE), J. Le Bot (CR PSH), C. Robin (DR LAE), S. Unsicker (Ass. Pr. MPI Jena)

Tuta absoluta est un herbivore qualifié de spécialiste, qui se développe exclusivement sur Solanacée et en particulier sur tomate (Biondi et al., 2018; Han et al., 2018). Actuellement aucune variété de tomate cultivée n'est véritablement résistante à *Tuta absoluta*, bien qu'une gamme de résistance modérée ait pu être caractérisée dans des études comparatives (Gharekhani and Salek-Ebrahimi, 2014; Rostami et al., 2017; Sohrabi et al., 2016, 2017). Certains traits de résistance identifiés sont liés à une forte densité en trichomes des feuilles et l'accumulation constitutive de sucres acylés à la surface des feuilles (Resende et al., 2006; Sohrabi et al., 2017). Ces traits de défenses sont caractéristiques de certaines espèces sauvages (*S. habrochaites*, *S. pennilii*) cousines de la tomate domestiquées pour laquelle ces traits ont été contre-sélectionnés (Biondi et al., 2018; Han et al., 2018).

Au début de nos travaux sur le modèle tomate x *Tuta absoluta*, peu d'informations étaient disponibles sur les mécanismes de défense mis en place par le plant de tomate en réponse à l'herbivorie de la mineuse. En se basant sur les mécanismes couramment induits chez les plantes en réponse à l'herbivorie, nous nous sommes intéressés à 3 d'entre eux : l'induction d'activités enzymatiques (polyphénols oxydase et péroxydase), l'émission de composés organiques volatils (COV) et l'accumulation en métabolites spécialisés présents dans les tissus. Nous avons ainsi caractérisés la réponse des plants de tomates soumis à l'herbivorie des larves chez des plants HN et avons également étudié l'influence de la nutrition azotée de la plante sur ces réponses en étudiant des plantes LN.

4.3.3.1 Défenses enzymatiques

En réponse à une attaque de bioaggresseurs, l'induction des activités enzymatique polyphénols oxydase (PPO) et péroxydase (POD) est un trait de défense commun chez les plantes. La PPO et la POD catalysent la formation de quinones à partir de composés phénoliques contenant une fonction catéchol. Ces quinones sont des molécules hyper-réactives pouvant se complexer et inactiver les protéines du système digestif de l'herbivore.

Nous avons caractérisé l'induction des activités PPO et POD dans tous les organes de jeunes plants de tomate (élevés en HN) sur lequel nous avions déposé 1, 6 ou 12 larves sur une seule feuille pendant 48h.

L'herbivorie des larves induit l'activité PPO dans les quatre compartiments foliaires analysés. En général, l'intensité de l'activité est corrélée positivement à la quantité de larves déposées. En revanche, aucun effet n'est observé dans les tiges et les racines (Fig. 23). L'activité POD est stimulée par l'herbivorie dans la feuille infestée, dans le lot de feuille en dessous le site d'infestation et dans les tiges. Le niveau maximum d'activité est obtenu avec 6 et 12 larves par feuille (Fig. 23).

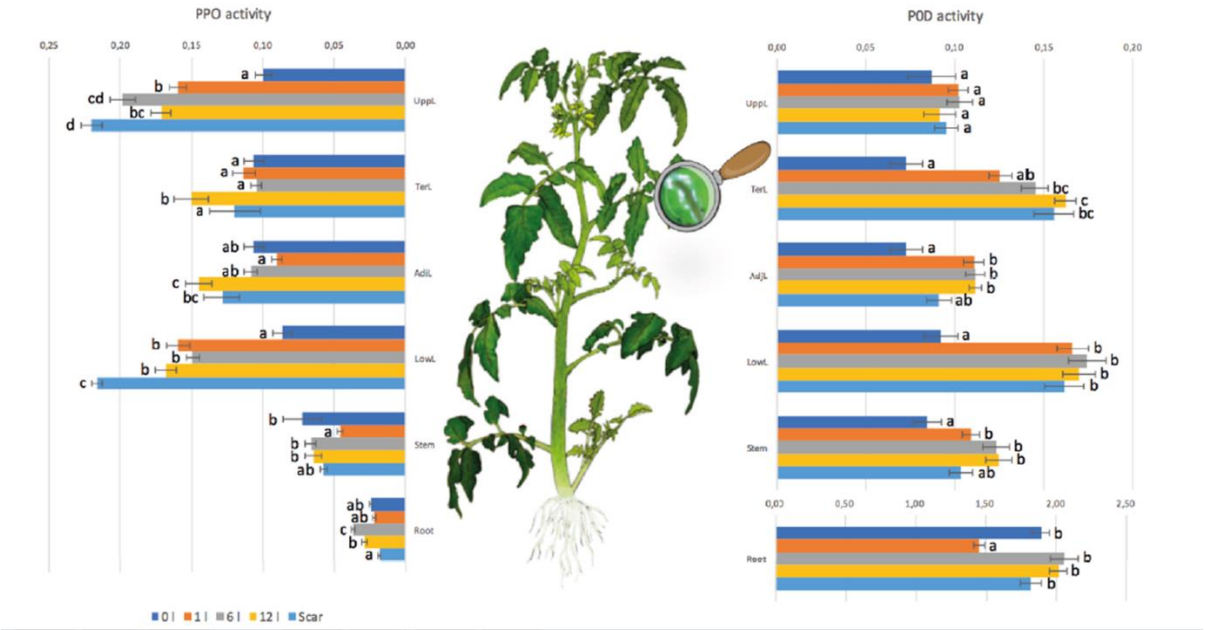


Figure 23 : Influence de la charge en larves sur l'induction des activités enzymatiques polyphénol oxydase (PPO) et péroxydase (POD) dans les différents organes du plant de tomate soumis à l'herbivore de larves de* Tuta absoluta *déposées sur une feuille.
Les larves de Tuta absoluta *(1, 6 ou 12) ont été déposées sur les trois folioles terminales d'une feuille (TerL). Après 48h d'herbivorie, les plantes ont été échantillonnées en distinguant les trois folioles infestées, les folioles saines de la feuille infestée (AdjL), les feuilles au-dessus de la feuille infestée (UppL), celles au-dessous (LowL), la tige (Stem) et les racines (Roots). Les activités ont été mesurées sur un extrait brut en présence d'acide caféique (PPO) ou de gaïacol (POD) en suivant l'absorbance à 470 nm sur 8 minutes. Issue de Coqueret (2017).*

L'influence de la nutrition azotée a pu être étudiée en comparant l'induction de l'activité PPO médiée par l'herbivorie d'une seule larve par plante sur de jeunes plants élevés sur une fertilisation HN ou LN. Dans ces conditions, nous observons une faible induction significative seulement sous HN. Cette observation doit néanmoins être pondérée par la faible réponse générée par la présence d'une seule larve, rendant difficile l'identification d'un effet significatif de la disponibilité en azote sur cette réponse.

4.3.3.2 COV

L'émission de COV constitue à la fois un moyen de défense directe contre le ravageur, mais aussi une défense indirecte par l'attrait d'auxiliaires et un moyen de communication plante/plante pouvant préparer la plante réceptrice à l'arrivée d'un ravageur (Godard et al., 2008; Halitschke et al., 2008; Moraes et al., 2001).

Nous avons voulu caractériser l'impact de l'herbivorie de *Tuta absoluta* et de la fertilisation N et sur le profil de COV émis par le plant de tomate. Ce type d'expérimentation requiert une instrumentation spécifique permettant le piégeage des COV en vue de leur analyse en GC-MS.

Nous avons bénéficié d'un soutien technique important au travers d'une collaboration avec Sibylle Unsicker et Jonathan Gershenzon du Max Planck Institute de Jena qui nous ont fourni le matériel nécessaire au piégeage et ont contribué à l'analyse des échantillons en accueillant notre doctorante V. Coqueret pendant 4 mois dans le cadre de l'Ecole Internationale de Recherche Agreenium et de l'Office allemand d'échanges universitaires (Deutscher Akademischer Austauschdienst).

Le piégeage des COV a été réalisé par le biais d'un système push-pull consistant à placer les plantes dans un sac hermétique et créer un flux d'air au moyen d'un pompe en entrée et d'une en sortie (Fig. 24 A, B). A la sortie du sac, une colonne contenant un adsorbant (Porapak-Q, Fig. 24 C) collecte les COV au cours du temps permettant une quantification d'émission sur la durée de l'expérimentation (54h). Durant l'expérimentation, une mesure plus ponctuelle à l'aide de micro-tubes PDMS (Fig. 24 D) a été réalisée. Celle-ci permet d'avoir une vision qualitative ponctuelle de la proportion de chaque COV dans le mélange. L'analyse des COV piégés sur l'adsorbant et sur les tubes PDMS a été réalisée à l'aide d'une GC-MS équipée d'un thermodésorbeur.

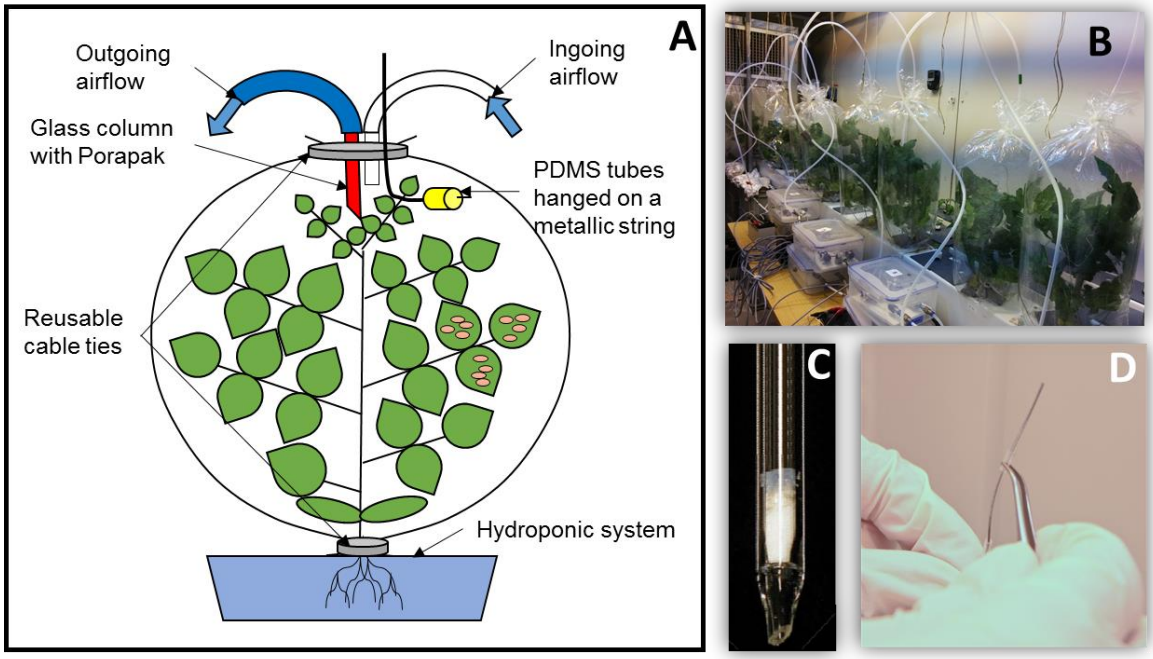


Figure 24 : Logistique expérimentale pour le piégeage de COV.
A- Schéma du système push-pull mis en place pour étudier l'impact de l'herbivorie de Tuta absoluta *et de la nutrition azotée sur l'émission de COV. Les plantes, cultivées en hydroponie et sur lesquelles sont déposées 12 larves, sont enfermées dans un sac hermétique dans lequel un flux d'air est généré par une pompe poussant l'air en entrée et une autre tirant l'air en sortie. Une colonne contenant l'adsorbant Porapak-Q est placée juste avant la sortie d'air. Il permet le piégeage en continu durant la durée de l'expérimentation. Par ailleurs, un tube PDMS est introduit ponctuellement dans l'enceinte pour réaliser un piégeage type « snapshot » au cours de l'expérimentation. B- Photographie du système installé en chambre de culture. C- Photographie d'un tube en verre contenant l'adsorbant Porapak-Q. D- Photographie d'un tube PDMS. Issue de Coqueret, (2017).*

L'analyse avec les tubes PDMS a permis de détecter 28 COV, alors que le piégeage sur colonne Porapak-Q a permis d'en détecter 33. Cependant seuls 13 composés ont été détectés en commun par les deux méthodes, ce qui illustre la spécificité de de chaque adsorbant pour des catégories de COV. En combinant les deux approches, l'herbivorie médiée par les larves de *T. absoluta* induit une modification de la composition du bouquet de composés volatils

émis par la plante avec une stimulation significative de l'émission de deux sesquiterpènes, le β-caryophyllène et l'humulène et une tendance à l'augmentation pour 5 monoterpènes (β-phellandrène, β-cis-ocimène, β-pinène, terpinolène, m-cymène). Ces résultats viennent abonder les données issues d'autres études portant sur les COV de tomate induits par *Tuta absoluta* (Backer et al., 2015; Silva et al., 2017; Strapasson et al., 2014). De manière intéressante, seul un petit nombre de composés sont communs à toutes les études, ce qui doit traduire une hétérogénéité dans les sorbants utilisés, les variétés de tomate étudiés mais aussi les modalités d'herbivorie appliquées. Parmi les COV dont nous avons montré l'induction de l'émission par l'herbivorie, trois (β-caryophyllène, l'humulène, β-cis-ocimène et β-phellandrène) présentent des activités d'attraction d'auxiliaires ou de répulsion déjà démontrées (Backer et al., 2017; Moraes et al., 2001; Pichersky and Gershenzon, 2002).

Bien que la fertilisation azotée n'impacte pas les modifications engendrées par l'insecte, la limitation en azote conduit à l'augmentation de 11 composés volatils (aldéhydes, cétones, esters d'acide) dont la phytohormone méthyl-salicylate qui est émise 3 à 5 fois plus que chez les plantes HN. Par ailleurs, sous LN, les plantes émettent également moins de monoterpènes (terpinène, terpinolène). Assez peu de travaux se sont intéressés à l'influence du régime de fertilisation azotée sur l'émission de COV. Chez la tomate, seule une étude récente a mené à l'identification de 8 COV dont l'émission est réduite sous forte nutrition en azote (Islam et al., 2017). L'identification du méthyl-salicylate dans le lot des COV induit par LN constitue un résultat important. En effet, le méthyl-salicylate est un composé attirant différents auxiliaires de culture (Rowen et al., 2017) ce qui peut conduire à l'hypothèse que la fertilisation LN peut favoriser la défense indirecte des plants de tomate.

4.3.3.3 Teneurs tissulaires en métabolites spécialisés

Nous avons mesuré l'impact de l'herbivorie, combinée ou non avec une nutrition azotée contrastée, sur la composition métabolique des différents organes du plant de tomate. Nous avons combiné une approche de métabolomique non ciblée destinée à identifier de manière globale les modifications métaboliques induites par l'herbivorie et une approche ciblée sur une nombre limité de métabolites spécialisés (essentiellement composés phénoliques et glycoalcaloïdes) pour lesquels nous avons mesurés l'impact de l'herbivorie et du niveau de fertilisation azotée sur l'évolution de leur concentrations.

La première approche, non ciblée, résumée en figure 25, a permis de montrer que l'herbivorie de 12 larves sur une feuille de tomate pendant 3 jours induit une modification importante de la composition métabolique de la feuille infestée (Fig. 25 B) ainsi que du reste du feuillage (Fig. 25 C), des tiges et des racines (non montré). Ces modifications se traduisent essentiellement par une forte accumulation de composés phénoliques, en particulier de la famille des phénolamides. Certains de ces composés, déjà cités dans ce document, comme la caféoyl putrescine (Fig. 25 E), sont initialement présents dans les tissus sains, mais leur accumulation est augmentée d'un facteur 5 à 15 en fonction des organes. D'autres composés sont indétectables dans les tissus sains mais s'accumulent fortement suite à l'herbivorie. C'est le cas de la N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl)-spermidine (Fig. 25 D) et de la kukoamine A décrites pour la première fois dans des tissus de tomate. Au total, cette approche a permis d'identifier 17 composés, dont 12 phénolamides dont l'accumulation est induite par l'herbivorie.

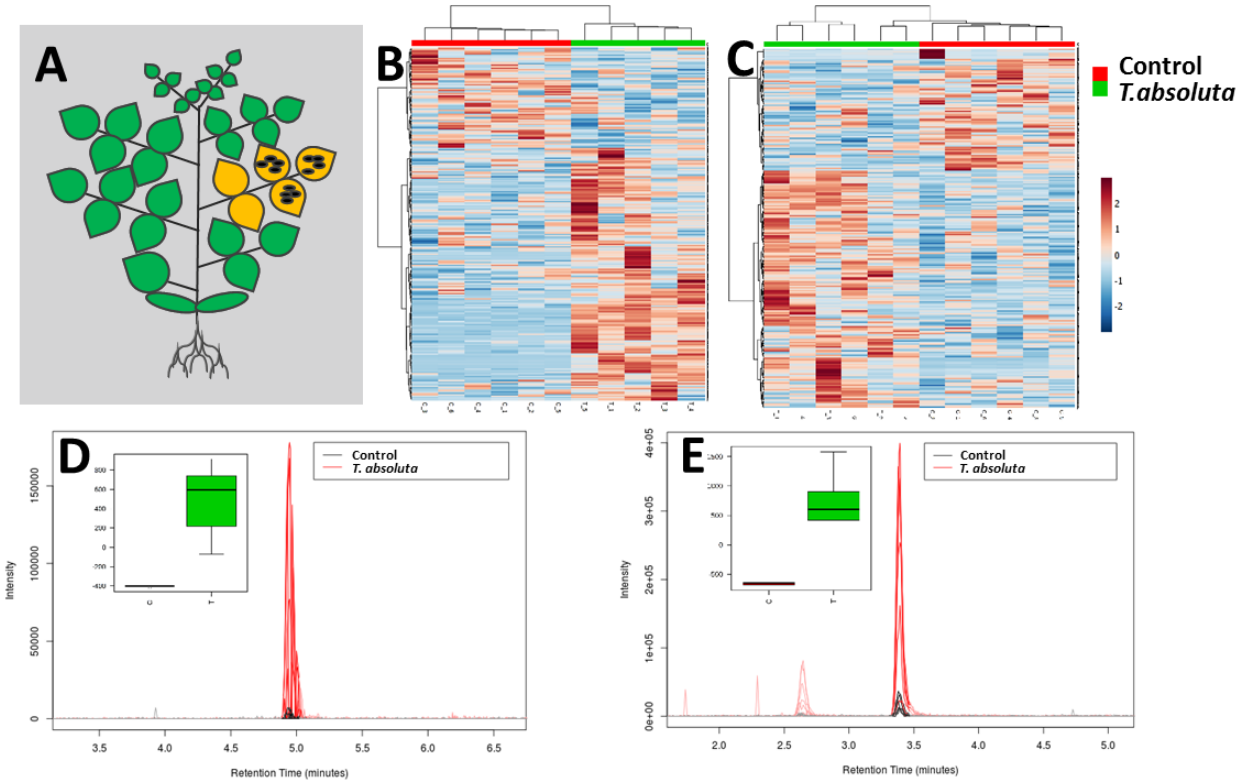


***Figure 25 : Réponse métabolique du plant de tomate induite par l'herbivorie de* Tuta absoluta.**
A- Schéma de la stratégie d'infestation du plant de tomate à l'aide de 12 larves réparties sur les trois folioles terminales d'une feuille. Après 3 jours, les feuilles sont récoltées, puis séparées en feuille local (jaune) et feuilles systémiques (verte). Les métabolites sont extraits puis analysés en UPLC-MS. B- Heatmap illustrant la composition métabolique des feuilles locales infestées ou non par Tuta absoluta. *C- Heatmap illustrant cette même réponse à* Tuta absoluta *dans les feuilles systémiques. D et E- Exemples de signaux métaboliques détectés uniquement dans les tissus des plantes infestées par* Tuta absoluta *avec la N1, N10-bis-(dihydrocaféoyl)-spermidine (D) et la caféoyl-putrescine (E).*

Par une analyse ciblée sur les principaux composés phénoliques de la feuille de tomate et la tomatine, nous avons quantifié les modifications de concentrations induits par l'herbivorie (12 larves) après 3 et 7 jours sur des plants élevés en HN ou LN, en distinguant plusieurs compartiments foliaires. Les résultats illustrés par les figures 26 et 27 confirment la forte induction de phénolamides (caféoyl-putrescine) en premier lieu dans les folioles infestées et les feuilles les plus jeunes dès 3 jours d'herbivorie. En comparaison, les autres classes de composés phénoliques sont peu impactées par l'herbivorie. L'accumulation d'acide chlorogénique et d'acide caféoyl hexarique est augmentée dans les feuilles les plus jeunes chez les plants infestés. La fertilisation azotée impacte l'accumulation de l'ensemble des métabolites mesurés comme décrit dans les travaux relatés dans le paragraphe 3.1.1, avec une plus forte accumulation de l'ensemble des métabolites sous LN. De manière intéressante, assez peu d'interactions apparaissent entre les effets de la fertilisation et de l'herbivorie. La fertilisation azotée ne semble pas avoir d'impact sur l'amplitude d'induction de la caféoyl putrescine comme l'illustre la faible aire de triangle en figure 26. Néanmoins, dans certains compartiments foliaires, l'accumulation en acide chlorogénique est diminuée suite à l'herbivorie de *Tuta absoluta* mais uniquement sous HN.

L'accumulation de tomatine est également induite en réponse à l'herbivorie, dans les folioles adjacentes au site d'infestation et dans les feuilles les plus matures principalement (Fig. 27).

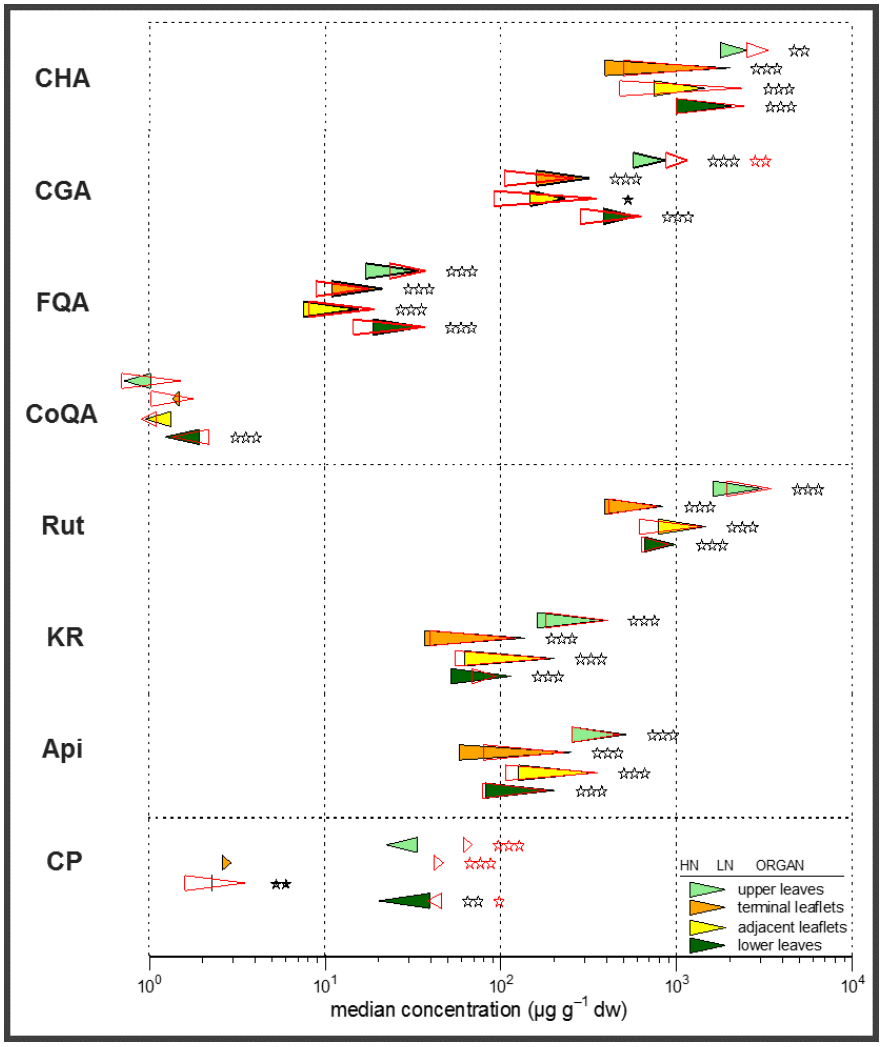


Figure 26 : Concentration en composés phénoliques dans les différents étages foliaires du plant de tomate infesté par des larves de* Tuta absoluta *pendant 7 jours.

Douze larves de Tuta absoluta *ont été déposées sur les trois folioles terminales d'une feuille. Après 3 et 7 jours d'herbivorie, différents compartiments foliaires (Folioles terminales infestées : Terminal leaflets ; folioles restants de la feuille infestée : Adjacent leaflets ; ensemble des feuilles au-dessus du site d'infestation : Upper leaves ; feuille en-dessous : Lower leaves) ont été échantillonnés et les composés phénoliques en ont été extraits et analysés en UPLC-DAD-MS. Les concentrations de chaque métabolite ont été calculées par rapport aux standards commerciaux correspondants. Pour chaque métabolite, le graphique décrit les concentrations mesurées dans chaque compartiment foliaire. Pour chaque compartiment foliaire deux triangles représentent la gamme de concentration mesurée sous HN et LN pour les plants sains (triangles noirs) et les plants infestés (triangles rouges). La pointe du triangle représente la concentration moyenne sous LN, tandis que la base du triangle représente la concentration moyenne sous HN. Ainsi l'écart entre les triangles rouges et noirs d'une même ligne illustre l'amplitude de la réponse à l'herbivorie, tandis que la surface du triangle illustre la différence d'accumulation du métabolite entre plants HN et LN. Les étoiles délimitées en noir indiquent la significativité de l'effet N, en rouge la significativité de l'effet herbivorie. Les étoiles pleines et noires indiquent la significativité d'une interaction N x herbivorie. Issue de Coqueret (2017).*

Cette étude permet donc de conclure que la composition métabolique des plants de tomate est fortement impactée par l'herbivorie de *Tuta absoluta,* quel que soit le régime de nutrition azotée. Cette modification se traduit par une forte accumulation locale et systémique de plusieurs phénolamides dont certains ne sont pas détectables dans les tissus des plantes saines, mais aussi une accumulation de tomatine et des variations de l'accumulation modérées en acide chlorogénique. Tous ces métabolites ont pu être reliés à

des caractères de résistance aux insectes ravageurs. Ainsi la diminution de l'accumulation en tomatine chez le mutant de tomate *jre4* est concomitantes à la prise de poids plus importante des larves de *Spodoptera lituralis* se nourrissant de ces feuilles (Nakayasu et al., 2018). L'accumulation en acide chlorogénique est identifiée comme un facteur de résistance au thrips et à *Trichobaris mucorea* chez le chrysanthème et *Nicotiana attenuata* (Lee et al., 2017; Leiss et al., 2009). Le rôle des phénolamides dans la défense des plantes a été étudié chez les Solanacées et les Poacées où leur accumulation est fortement induite par les herbivores (Alamgir et al., 2016; Gaquerel et al., 2014). Les phénolamides pourraient protéger les plantes au moins de deux manières ; par antixénose repoussant les femelles adultes et réduisant ainsi l'oviposition comme démontrée dans le système *Bemisia tabacii* / poivron (Tebayashi et al., 2007), ou par antibiose (toxicité directe) lors de l'ingestion, entraînant un allongement du temps de développement et/ou une augmentation de la mortalité de l'insecte nuisible (Alamgir et al., 2016; Kaur et al., 2010).

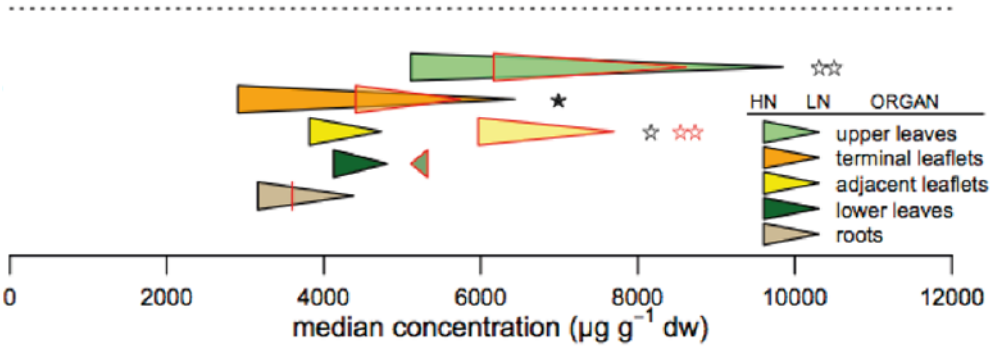


Figure 27 : Concentration en tomatine dans les différents étages foliaires et les racines du plant de tomate infesté par des larves de* Tuta absoluta *pendant 7 jours.
Le descriptif de cette figure est donnée est Fig. 26. Issue de Coqueret (2017).

4.4 Conclusions

La thématique que nous avons développée C. Robin et moi autour de l'étude de la fertilisation azotée comme modulateur de l'équilibre croissance défense a fortement évolué au cours des années passées. Nous sommes ainsi partis d'un modèle d'étude relativement simple (une plante, un facteur de variation, mesure de quelques variables indicatrices) pour évoluer vers un modèle beaucoup plus complexe et intégratif. En effet, la plante est ainsi soumise à un stress biotique combiné à une limitation d'ordre abiotique conduisant à l'acquisition d'un grand nombre de données de par les variables mesurées sur la plante et le ravageur, et le développement d'analyses métabolomiques et transcriptomiques.

D'un point de vue personnel, cette thématique m'a permis d'étoffer considérablement mes compétences, initialement centrées sur la biologie moléculaire et l'enzymologie, et qui intègrent désormais l'écophysiologie de la plante, l'écologie chimique, la métabolomique et des notions de modélisation. Ces compétences ont été acquises par l'expérimentation bien sûr, mais aussi, et surtout, par les différentes collaborations établies au fur et à mesure de ma progression sur cette thématique. A ces compétences scientifiques et techniques, j'ajouterai des compétences d'encadrement au travers de la co-direction de 3 thèses et 5 M2.

D'un point de vue scientifique, nous avons montré qu'un niveau de fertilisation en N limitant la croissance de la plante a pour conséquence une augmentation de la concentration

tissulaire de plusieurs familles de métabolites spécialisés solubles (acides hydroxycinnamiques, flavonoïdes, anthocyanes, glycoalcaloïdes) ainsi que l'augmentation de l'émission de certains composés organiques volatils (aldehydes, cétones, esters d'acides), ce qui en accord avec la théorie GDBH (Larbat et al., 2012a,b, 2014 ; Royer et al., 2013, Coqueret 2017). Si on descend à l'échelle de l'organe, cette relation stricte à la théorie GDBH est valable pour les organes végétatifs aériens (tiges, feuilles), mais ne s'applique pas, en revanche, pour les racines dans la mesures où la croissance racinaire n'est pas affectée, voire peut être stimulée par une diminution de la fertilisation azotée, tout comme l'accumulation en composés phénoliques (Larbat et al., 2012a). Parmi les métabolites spécialisés dont la concentration dans les tissus, ou dont l'émission est stimulée, certains sont identifiés comme des marqueurs de résistance à des bioagresseurs (acide chlorogénique, flavonoïdes, méthyl-salicylate). La mise en place des effets d'une limitation de la fertilisation en azote est de l'ordre de quelques jours pour l'accumulation en composés phénoliques et cette accumulation peut être maintenue sur des périodes relativement longues (10-15 jours) pour certains d'entre eux après un retour sur une fertilisation non limitante pour la croissance (Larbat et al., 2012b). L'ensemble de ces résultats suggère un fort potentiel du pilotage de la nutrition azotée du plant de tomate comme levier de protection contre divers agresseurs.

Pour valider expérimentalement cette hypothèse, nous avons utilisé le ravageur *Tuta absoluta* comme un modèle de bioagresseur. Effectivement, la limitation en azote des plantes a une incidence négative sur le développement de l'insecte (Larbat et al., 2016, Coqueret et al., 2017, Coqueret 2017). Nous pouvons expliquer cet effet par une composante « trophique » (Coqueret et al., 2017), toutefois nous ne pouvons pas exclure une composante « stimulation des défenses constitutives » (accumulation en métabolites spécialisés solubles) qui doit encore être validée expérimentalement. Cette validation pourrait prendre la forme d'un biotest consistant à fournir des quantités connues de molécules purifiées dans l'alimentation des insectes, ou bien d'une étude de la survie et du développement des insectes se nourrissant sur les plants de tomate incapables d'accumuler les métabolites en question. La série de travaux portant sur l'étude des défenses enzymatiques (PPO, POD), l'émission de COV et l'accumulation de métabolites solubles en réponse à l'herbivorie de *Tuta absoluta* sous différents niveaux de fertilisation azotée n'a, par contre, pas mis en évidence d'effet d'interaction entre herbivorie et fertilisation. Ce résultat suggère que l'effet de la fertilisation azotée ne passe probablement pas par une stimulation des défenses induites de la plante.

L'identification d'un impact négatif de la limitation en azote du plant de tomate sur le développement de *T. absoluta*, va dans le même sens que ce qui a pu être observé précédemment avec *Pseudomonas syringea*, agent de la moucheture bactérienne (Hoffland et al., 2000b). Cependant, cet effet n'est pas forcément généralisable à l'ensemble des bioagresseurs de la tomate comme l'illustre la plus forte susceptibilité au champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* (agent de la pourriture grise) de plants limités en azote (Hoffland et al., 1999; Lecompte et al., 2010). Cette diversité d'effet doit s'expliquer par les profondes modifications métaboliques engendrées par la modification de la disponibilité en azote au regard des besoins et des sensibilités du bioagresseurs. Nous avons vu par exemple que les tissus des plantes limitées en azote accumulent plus de sucres solubles (glucose, fructose), une ressource carbonée recherchée par les champignons nécrotophes, et que le profil d'accumulation en composés phénoliques est également modifié (plus de flavonoïdes et d'acides hydroxycinnamiques, mais moins de phénolamides), modifiant potentiellement la gamme de bioagresseurs affectés par ce système de défense (Royer et al., 2013; Larbat et al., 2014).

Dans mon projet, *Tuta absoluta* n'est pas uniquement vu comme un modèle de bioagresseur par lequel nous validons de manière fonctionnelle la modification de l'équilibre croissance-défense du plant de tomate par la fertilisation en azote. *Tuta absoluta* est un ravageur majeur représentant un menace forte sur la production mondiale de tomate, en raison (*i*) de l'expansion spectaculaire de son aire de répartition (Europe, Afrique, Asie depuis 2006), (*ii*) de l'importance des dégâts engendrés dans les cultures et (*iii*) de la difficulté de son contrôle avec une lutte chimique inefficace (développement de résistances multiples aux insecticides) et un contrôle biologique encore peu développé (Biondi et al., 2018; Campos et al., 2017; Han et al., 2018). Ainsi les travaux que je mène sur l'étude de l'interaction tomate-*Tuta absoluta* ont pour objectif de proposer de nouvelles pistes pour développer le biocontrôle de ce ravageur. L'effet de la fertilisation azotée, mais également l'étude fine des réponses de la plante à l'agression m'amène à développer un programme de recherche intégrant cette thématique et qui sera présenté dans le chapitre suivant.

Avec l'aide de spécialistes en modélisation, j'ai contribué au développement d'un premier modèle de répartition du carbone entre voies métaboliques impliquées dans la croissance et dans la défense. Ce modèle, basé sur une hypothèse relativement simple (l'homéostasie du saccharose sous différents régimes d'alimentation azotée), fournit des prédictions en accord avec nos données expérimentales et celles de la littérature et nous a permis d'identifier des étapes potentiellement clé pour le contrôle de la répartition du carbone (Larbat et al., 2016). Ce modèle demeure cependant très théorique et n'intègre pas toute la complexité d'une plante. Les travaux récents de Campos et al. (2016) pointent en effet les voies de régulation par les phytohormones et leurs interactions, comme un point crucial de la modulation de l'équilibre croissance – défense. Par ailleurs, comme nous l'avons vu, les réponses à la disponibilité en azote sont spécifiques des organes. Le développement d'un modèle prenant en compte la compartimentation à l'échelle de l'organe, voire en dessous (tissus, cellules, organites), mais aussi les régulations pour les phytohormones, est donc une nécessité. La modélisation est une approche puissante pour intégrer un ensemble de processus biologiques, identifier des questions de recherche nouvelles et orienter la mise en place d'expérimentations. En biologie des plantes, la modélisation est beaucoup utilisée sur des thématiques liées à la qualité des produits récoltés ou bien l'adaptation des plantes à des variations de l'environnement biotique et abiotique. Cependant, bien que le métabolisme spécialisé soit impliqué à la fois sur la qualité des produits et la réponse des plantes à l'environnement, quasiment aucun modèle ne l'inclut de manière détaillée en raison principalement de sa grande diversité et de sa spécificité (une multitude de voies de biosynthèse et un métabolisme spécialisé très différent d'une espèce à une autre). Le développement d'un modèle de répartition du C entre métabolismes primaire et spécialisé à l'échelle de la plante est donc un objectif important en vue de pouvoir estimer les coûts métaboliques engendrés par l'activation de voies métaboliques spécifiques en réponse à des agressions biotiques. Le premier modèle que nous avons élaboré pourra constituer une base pour le développement d'un modèle à l'échelle de la plante entière qui sera décrit dans le prochain chapitre.

Le bilan que je dresse ici est globalement très positif. Néanmoins, je suis conscient de certaines limites des choix et approches utilisés jusqu'alors, et, si on me posait la question « si tu pouvais revenir 12 ans en arrière, referais-tu les mêmes choix ? » la réponse serait Oui, mais avec deux bémols :

- l'âge des plantes étudiées : L'ensemble de mes travaux a été réalisée sur des plants de tomate très jeunes (en général 25 à 40 jours après germination), échantillonnés avant floraison. Ce choix s'est imposé pour des raisons d'espaces disponibles (serres ou chambre de culture) au regard du nombre de plantes nécessaires pour mettre en place une étude d'écophysiologie robuste, pour des raisons de temps de culture, mais aussi pour des raisons techniques parce que le système de suivi de fertilisation en N utilisé (automate Totomatix à l'unité PSH) était initialement adapté pour des plantes avec des chevelus racinaires restreints. La phénologie de la plante ayant un poids important sur sa capacité de réponse à des stimuli environnementaux, les effets observés de la limitation en N et la réponse à l'herbivorie de *Tuta absoluta* devront être validés sur des plantes plus agées au stade fructification. Par ailleurs,, dans le cadre de l'étude de l'équilibre croissance-défense et dans l'optique d'utiliser la nutrition azotée comme levier agronomique de modulation de la défense des plantes, la mesure du rendement en fruit (total et commercialisable) et la détermination des conséquences sur la qualité du fruit (goût, aspect, conservation…) sont essentiels.

- La prise en compte de la génétique dans cette étude écophysiologique: La question de la réponse de divers génotypes de tomate à une limitation de la nutrition azotée a été abordée lors de ma toute première expérimentation sur cette thématique. Cependant, la question n'était pas tant d'étudier l'interaction génotype x environnement que de choisir un cultivar de tomate pouvant être considéré comme un modèle d'étude sur cette thématique. Ainsi, suite à cette première étude, nous avons concentré nos travaux sur deux variétés Pixie, puis Better Bush, réunissant à la fois un critère de petite taille (il s'agit de variétés à croissance déterminée) et une réponse marquée à la limitation de la fertilisation azotée. A défaut de l'avoir intégré avant à mon étude, la prise en compte du facteur génétique doit être abordée à la fois sur les questions de réponse à des leviers agronomiques comme la fertilisation en azote, mais aussi sur des questions de résistance au ravageur *Tuta absoluta*.

Mon projet de recherche, présenté dans les pages suivantes, prend en compte ces limites.

Publications

Han, P, Becker, C., Le Bot, J., Larbat, R., Lavoir, A.V., Desneux, N. Density- and trait-mediated indirect interactions in a “diamond” food web. *Journal of Ecology* In press.

Han, P., Desneux, N., Becker, C., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., Zhang, J., and Lavoir, A.-V. (2018). Bottom-up effects of irrigation, fertilization and plant resistance on *Tuta absoluta*: implications for Integrated Pest Management. *J. Pest Sci*

Coqueret, V., Le Bot, J., Larbat, R., Desneux, N., Robin, C., Adamowicz, S. (2017). Nitrogen nutrition of tomato plant alters leafminer dietary intake dynamics. *Journal of Insect Physiology, 99*, 130-138.

Larbat, R., Robin, C., Lillo, C., Drengstig, T., Ruoff, P. (2016). Modeling the diversion of primary carbon flux into secondary metabolism under variable nitrate and light/dark conditions. *Journal of Theorical Biology*, 402 : 144-157

Larbat, R., Adamowicz, S., Robin, C., Han, P., Desneux, N., Le Bot, J. (2016). Interrelated responses of tomato plants and the leaf miner *Tuta absoluta* to nitrogen supply. *Plant Biology, 18, 495-504*.

Royer, M., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., Nicot, P.C., Robin C. (2016). Tomato response traits to pathogenic Pseudomonas species. Does nitrogen limitation matter? *Plant Science, 244, 57-67*

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.

Royer, M., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., Robin, C. (2013). Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato?. *Phytochemistry, 88*, 25-33.

Larbat, R., Olsen, K. M., Slimestad, R., Lovdal, T., Benard, C., Verheul, M., Bourgaud, F., Robin, C., Lillo, C. (2012). . Influence of repeated short-term nitrogen limitations on leaf phenolics metabolism in tomato. *Phytochemistry, 77*, 119 - 128.

Larbat, R., Le Bot, J., Bourgaud, F., Robin, C., Adamowicz, S. (2012). . Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation. *Plant Biology, 14* (5), 760 - 769.

Rapports

Sustainability in the vegetable food supply chain – overview of the results of the project SUNNIVA (2017)

Nicolas Grippon : 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’étude de fluxomique sur la voie des composés phénoliques. Mémoire de M2 (2010).

Thaïs Génard : Développement d’une méthode d’introduction de phénylalanine marquée au ^{13}C dans les feuilles de tomate en vue d’études de flux métaboliques de la voie de synthèse des polyphénols. Mémoire de M2 (2012)

Imane Mechai : Fonctionnement de la plante agressée : Impact de l’attaque de *Tuta absoluta* sur les échanges gazeux foliaires, l’assimilation de l’azote et l’accumulation de composés de défense chez la tomate. Mémoire de M2 (2013)

Alizée Schahl : Croissance et développement de la tomate et composition des organes en phytomicronutriments et composés de défense : effets d'apports de matières organiques végétales dans le substrat de culture. Mémoire de M2 (2016)

Thèses

Mathilde Royer (2009-2013). Etude des relations entre croissance, concentrations en métabolites primaires et secondaires et disponibilité en ressources chez la tomate avec ou sans bioagresseurs.

Victoire Coqueret (2013-2017). Fonctionnement de la plante agressée : détermination des coûts et bénéfices de la défense de la tomate vis-à-vis de *Tuta absoluta.*

Marwa Roumani (2018-2021) Rôle des phénolamides de la tomate sur la physiologie de la plante (croissance, fertilité, défense) et intérêts thérapeutiques.

5 Perspectives de recherche

Au cours de ces 12 dernières années, j'ai contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques mis en jeu dans l'adaptation des plantes à leur environnement. En 12 ans, les approches et les méthodes ont évolué de manière spectaculaire et ouvrent des portes qui étaient de l'ordre de la science-fiction en 2007. Au gré des résultats obtenus, de nouvelles pistes se sont dessinées que je souhaite à présent explorer. Comprendre les mécanismes de synthèse et de régulation de métabolites spécialisés est une chose, comprendre leurs rôles écologiques et comment les utiliser en est une autre.

La figure 28 illustre l'évolution de mes thématiques de recherche depuis 2007 et leurs perspectives. Les thématiques initiales, portant sur la description de voies du métabolisme spécialisé et leur régulation par l'environnement, se sont à la fois diversifiées et enrichies les unes les autres. L'étude du ravageur *Tuta absoluta* à partir de 2011 a initialement représenté un modèle de bioagresseur permettant de valider nos travaux sur la modulation de l'équilibre croissance-défense *via* la fertilisation azotée. Dans le même temps, la question de la protection des cultures contre ce ravageur (au travers du levier fertilisation de la plante notamment) a émergé pour constituer un axe majeur de mes recherches. Cette question est également abordée dans le cadre plus large du contrôle biologique des cultures requérant des méthodes et pratiques protégeant les cultures contre une large gamme de bioagresseurs avec un recours à la chimie de synthèse restreint voire banni.

Par ailleurs, les connaissances et les outils d'analyses de la voie de furocoumarines m'ont permis (i) de transposer ce travail de caractérisation à la voie des phénolamides, famille de métabolites répondant de façon singulière à la fertilisation azotée et à l'herbivorie de *Tuta absoluta* chez la tomate, et (ii) de développer un modèle original d'étude pour contribuer à comprendre l'équilibre croissance-défense.

Enfin, l'étude des phénolamides devient maintenant un sujet important de mes recherches aux travers des questions de leurs rôles physiologiques chez la tomate, mais aussi de leurs propriétés thérapeutiques.

Dans la suite de ce chapitre, je décrirai mes perspectives de recherche autour de 5 thématiques (Fig. 28).

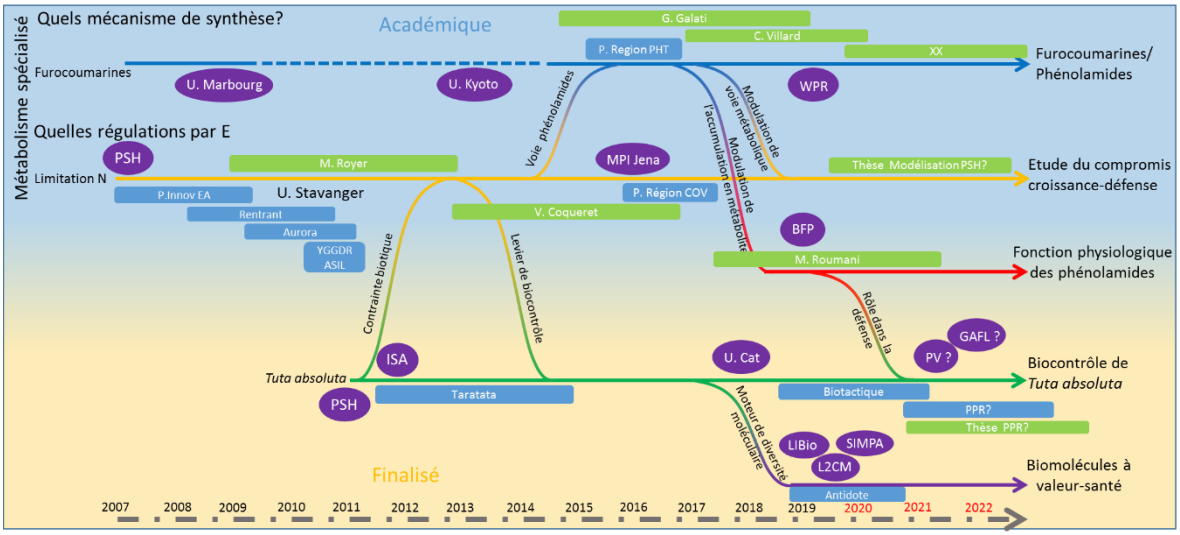


Figure 28 : Evolution et connexions de mes thématiques de recherche depuis 2007 et perspectives.
Les sigmoïdes représentent les ponts entre les différentes thématiques développées à l'heure actuelle. Les projets sont représentés dans les cadres bleus et sont positionnés en fonction des thématiques auxquelles ils sont reliés. De même, les thèses que j'ai co-dirigées ou que je co-dirige sont indiquées en vert. Enfin, les partenaires majeurs externes au laboratoire sont représentés en violet. Hormis avec l'université de Marbourg dont la collaboration s'est arrêtée suite au départ en retraite du Pr. Matern (2008), l'ensemble des collaborations est encore actif. La taille des cadres bleus et verts indique la durée des projets et des thèses. En revanche, concernant les collaborations, la position sur la frise chronologique indique uniquement le démarrage. Le dégradé de couleurs illustre le passage d'une recherche essentiellement académique en début de carrière vers des recherches plus équilibrées entre académique et à visée finalisée.

5.1 Description de voies de biosynthèse de métabolites spécialisés

Contributeurs : C. Charles (TR LAE), G. Galati (Doct. LAE 2015-2019, ATER 2019-2020), J. Grosjean (IE LAE), A. Hehn (Pr. LAE), T. Kitajima (Pr. U. Kyoto), R. Larbat (CR LAE), S. Legay (Dr. LIST), R. Munakata (Postdoc LAE), A. Olry (IR LAE), M. Roumani (Doct. LAE 2018-2021), E. Schranz (Dr. Wageningen Plant Research), C. Villard (Doct. LAE 2017-2020), X (Doct. LAE 2020-2023).

Le métabolisme spécialisé est le métabolisme d'adaptation des plantes à leur environnement. S'il est avéré que les métabolites spécialisés sont extrêmement différents, il semble également clair que cette diversité repose sur des familles enzymatiques relativement conservées d'une plante à une autre. Ainsi on trouve des dioxygénases, des cytochromes P450s, des transférases… Chacune de ces familles d'enzymes a ses spécificités. Comprendre le fonctionnement de ces voies de biosynthèses de manière générale nécessite de comprendre ces enzymes et les processus évolutifs qui ont mené à leur émergence.

5.1.1 Furocoumarines

Contributeurs : C. Charles (TR LAE), G. Galati (Doct. LAE 2015-2019, ATER 2019-2020), J. Grosjean (IE LAE), A. Hehn (Pr. LAE), T. Kitajima (Pr. U. Kyoto), R. Larbat (CR LAE), S. Legay (Dr. LIST), A. Olry (IR LAE), E. Schranz (Dr. Wageningen Plant Research), C. Villard (Doct. LAE, 2017-2020), X (Doct. LAE 2020-2023).

Les travaux que nous avons réalisés ces 17 dernières années ont permis d'identifier des gènes codant pour l'ensemble des enzymes impliquées dans la synthèse des furocoumarines linéaires majeures. Ces gènes ont été clonés à partir de différentes espèces. Or, il est maintenant clair que l'apparition de la voie des furocoumarines résulte d'un processus de convergence évolutive (Munakata et al., 2019 ; Limones et al., Plant Science sous presse). La

question est maintenant de savoir comment cette voie est apparue dans les principales familles botaniques où les furocoumarines sont rapportées (Apaiacées, Moracées, Rutacées, Légumineuses). Cette question peut s'étendre aux furocoumarines angulaires dont encore peu d'étapes enzymatiques ont été décrites au niveau moléculaire.

Pour répondre à ces questions évolutives, le premier travail consiste à identifier de nouveaux gènes codant (i) des enzymes de la voie des linéaires chez d'autres espèces que celles et (ii) des enzymes de la voie des angulaires dans les espèces pour lesquelles la voie des linéaires est caractérisée (panais principalement, figuier).

Notre travail de caractérisation portera sur les trois familles botaniques sur lesquelles nous avons acquis une forte expertise : Apiacées, Moracées et Rutacées. Sur ces modèles, nous combinerons des approches de métabolomique menées en parallèles d'approches de transcriptomique :

- L'approche de transcriptomique différentielle sur les banques RNAseq de figuier a montré son fort potentiel avec le clonage récent de l'Umbelliferone dimethylallyltransferase (UDT) et de la marmésine synthase. Nous poursuivons l'analyse de ces banques pour compléter la caractérisation chez le figuier (Thèse C. Villard en cours, nouvelle thèse débutant en 2020).

- Du côté du panais, les efforts réalisés récemment n'ont pas payé, mais la construction d'une nouvelle banque RNAseq de racines blessées nous offre un nouveau réservoir de gènes dans lequel prospecter. Nous envisageons de construire également une banque de racines non blessées afin de pouvoir développer une approche différentielle (collaboration se poursuivant avec S. Legay du LIST).

- A partir de la famille des Rutacées, nous avons déjà identifié deux gènes de la voie (dioxygénase, C2'H de *Ruta graveolens,* Vialart et al., 2012, CYP82D64 de *Citrus paradisi*, Limonès et al., sous presse). Par ailleurs, les travaux de thèse d'Audray Dugrand-Judek (2012-2015) et Mariana Limonès (2016-2019) ont mis en évidence des accumulations en furocoumarines différentes entre variétés d'agrumes (Dugrand et al., 2013), mais aussi entre tissus du fruit (accumulation plus importante dans le flavédo[4] que dans l'albédo[5]). Ces données nous fournissent des pistes pour le développement d'une approche de transcriptomique différentielle entre espèces d'agrumes ou entre tissus.

Le clonage et l'identification de nouveaux gènes de cette voie fournira de nouveaux sujets pour une étude phylogénique à l'image des travaux réalisés par Ryosuke Munakata au cours de son post-doc dans l'équipe (Munakata et al., 2019) ou des travaux tout juste initiés que mène Cloé Villard sur la marmésine synthase de figuier et qui fait l'objet d'une collaboration avec le laboratoire de Biosystématique du Dr. Eric Schranz à Wageningen.

5.1.2 Phénolamides

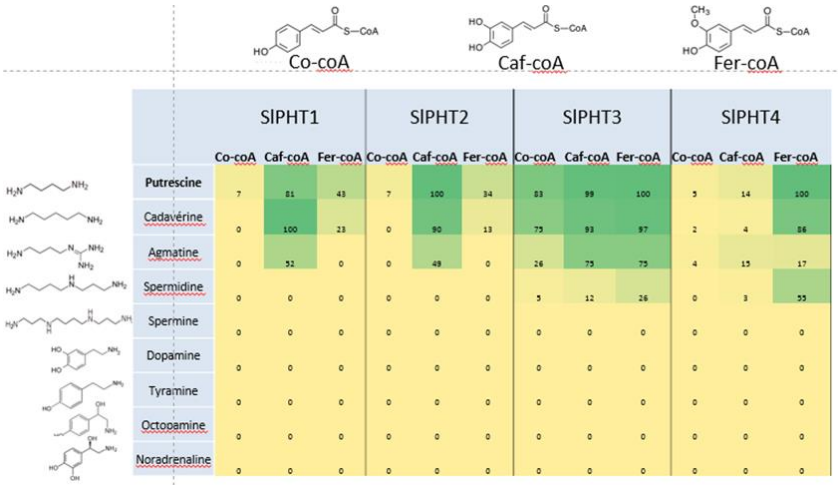
Contributeurs : C. Charles (TR LAE), A. Hehn (Pr. LAE), R. Larbat (CR LAE), C. Robin (DR, LAE), M. Roumani (Doct. LAE 2018-2021).

[4] Partie la plus externe colorée du la peau des agrumes.
[5] Partie interne blanche de la peau des agrumes.

La voie de biosynthèse des phénolamides est apparue comme une voie d'intérêt en raison (*i*) de l'évolution spécifique de cette famille de métabolites spécialisés en réponse à une diminution de la nutrition N et (*ii*) de l'augmentation très forte de l'accumulation de nombreux métabolites de cette famille en réponse à l'herbivorie de *Tuta absoluta*.

Les phénolamides regroupent un ensemble de métabolites consistant en l'association d'un ou plusieurs acides hydroxycinnamiques avec des mono ou polyamines. Pour leur biosynthèse, les transférases de la famille BAHD semblent jouer un rôle clé (Fig. 2). Les transférases déjà identifiées dans cette voie de biosynthèse présentent des spécificités importantes pour la partie amine. Ainsi, trois grands types de transférases ont pu être identifiés. Les tyramine hydroxycinnamoyl transferases (THT) sont capables d'associer les acides phénoliques à des dérivés monoamines phénoliques comme la tyramine, la dopamine ou l'octopamine. Les SHT (spermine hydroxycinnamoyl transferase) réalisent l'association sur des polyamines comme la spermine ou la spermidine. Enfin, les PHT (putrescine hydroxycinnamoyl transferases) associent les acides phénoliques à des diamines comme la putrescine, l'agmatine ou la cadavérine. Chez la tomate, une petite famille multigénique codant des THT a été identifiée (Roepenack-Lahaye et al., 2003). Cependant, dans le cas des phénolamides dont l'accumulation est modifiée par la fertilisation ou l'herbivorie de *Tuta absoluta* (caféoyl putrescine, dérivés spermidine et spermine) aucun gène de transférase n'a été décrit chez la tomate.

J'ai décidé de rechercher les gènes codant pour ces deux types de transférase chez la tomate à partir de 2015. Dans le cas des PHT, une première séquence avait été clonée et identifiée chez *Nicotiana attenuata* en 2012 (Onkokesung et al., 2012). Avec le soutien financier de la région Lorraine et au travers de l'encadrement de deux stages de L3 (Hadjara Saindoux, 2015 ; Krissie Loisy, 2016), j'ai réussi à cloner quatre séquences orthologues chez la tomate. L'analyse fonctionnelle des 4 enzymes montre qu'elles sont toutes capables de catalyser le transfert d'acide hydroxycinnamique sur des diamines, mais avec des spécificités de substrats parfois différentes (Tab. 6). Par ailleurs, leur profil d'expression dans la plante, indique une régio-spécificité pour chacune des 4 PHT (Fig. 29). Chez la tomate, il semble donc que la synthèse de dérivées putrescine (caféoyl putrescine et féruloyl putrescine) est catalysées par une petite famille multigénique codant 4 PHT.



	SlPHT1			SlPHT2			SlPHT3			SlPHT4		
	Co-coA	Caf-coA	Fer-coA	Co-coA	Caf-coA	Fer-coA	Co-coA	Caf-coA	Fer-coA	Co-coA	Caf-coA	Fer-coA
Putrescine	7	81	43	7	100	34	83	99	100	5	14	100
Cadavérine	0	100	23	0	90	13	75	93	97	2	4	86
Agmatine	0	52	0	0	49	0	26	75	75	4	15	17
Spermidine	0	0	0	0	0	0	5	12	26	0	3	55
Spermine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dopamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tyramine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Octopamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Noradrenaline	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tableau 6 : Diversité et spécificité des substrats catalysés par SlPHT1-4.
La structure des donneurs d'acyl est présentée en haut du tableau, celle des receveurs d'acyl à gauche du tableau. Les valeurs (0 à 100) et les couleurs (jaune à vert) sont indicatrices de l'efficacité de la réaction. Co-coA : coumaroyl-coA ; Caf-coA : caféoyl-coA ; Fer-coA : féruloyl-coA.

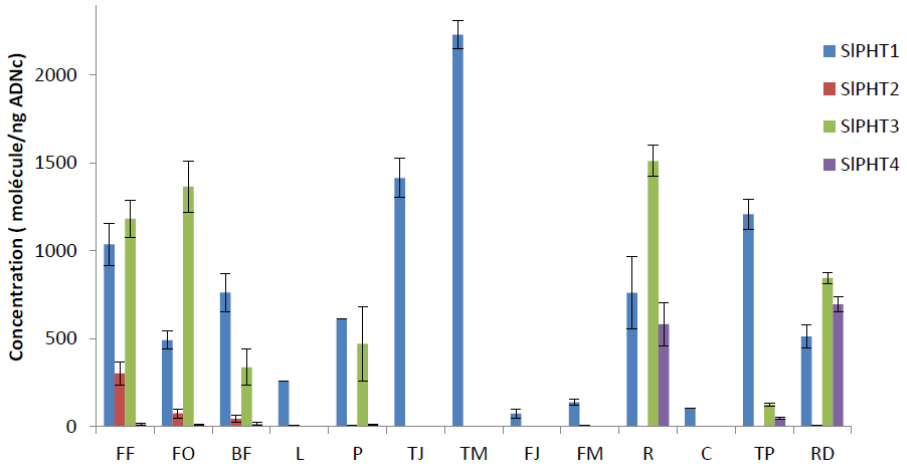


Figure 29 : Profil d'expression de SlPHT1-4 dans le plant de tomate.
FF : Fleur fermée ; FO : Fleur ouverte ; BF : Bouton floral ; TJ : Section de jeune tige ; TM : Section de tige mature ; FJ : Feuille jeune ; FM : Feuille mature ; R : Racine ; C : Cotylédons ; TP : Tiges de plantule ; RD : Radicelle de plantule.

L'identification de transférase catalysant la synthèse des dérivés spermine et spermidine s'accumulant en réponse à l'herbivorie de *Tuta absoluta* reste encore à faire. Cette question est traitée dans le cadre de la thèse de Marwa Roumani (soutenance prévue en janvier 2021). Pour identifier des gènes candidats nous pouvons nous appuyer sur les données de transcriptomique différentielle de banques RNAseq que j'ai faites construire à partir de feuilles de tomate soumises ou non à l'herbivorie de larves de *Tuta absoluta*. L'analyse de ces banques a fait ressortir 8 gènes candidats dont la fonction est en cours de caractérisation.

L'identification des enzymes catalysant la synthèse de ces métabolites est un pré-requis dans l'optique d'identifier précisément leur(s) fonction(s) physiologique(s) chez la tomate.

5.2 Fonction physiologique des phénolamides

Contributeurs : S. Besseau (MCF Univ. Tours), C. Charles (TR LAE), A. Fauvet (TR, LAE), D. Gagneul (MCF Univ. Lille), A. Hehn (Pr LAE), M. Hernould (Pr. BFP), H. Jary (M2 LAE 2020), R. Larbat (CR LAE), A-V. Lavoir (MCF ISA), C. Robin (DR LAE), M. Roumani (Doct. LAE 2018-2021), X (M1 LAE 2020).

Une grande question concernant l'étude du métabolisme spécialisé est la fonction physiologique de ces molécules dans la plante. Il existe de nombreuses études montrant un rôle potentiel de ces molécules basées très souvent sur des études réalisées *in vitro* ou dans des systèmes cellulaires. Par contre, l'étude de la fonction *in planta* est relativement peu abordée car, jusque là, les outils et les dispositifs expérimentaux n'étaient pas forcément disponibles. Le cas des phénolamides est emblématique.

Ces métabolites sont présents dans une grande diversité d'espèces végétales incluant mono- et dicotylédones (Bienz et al., 2005; Herrmann and Nagel, 1989; Martin-Tanguy et al., 1978). Dans la plante, ils peuvent être retrouvés dans tous les organes et peuvent s'accumuler à de fortes concentrations dans les organes floraux, à la surface des grains de pollen, dans les graines, mais aussi dans les organes végétatifs blessés ou infectés (Grienenberger et al., 2009; Kaur et al., 2010; Luo et al., 2009; Onkokesung et al., 2012; Roepenack-Lahaye et al., 2003; Vogt, 2018; Zacarés et al., 2007). Leur rôle physiologique a été l'objet de nombreuses hypothèses (implication dans le renforcement des parois, initiation florale, fertilité) qui n'ont

pas été validées expérimentalement (Bassard et al., 2010; Vogt, 2018). Certains phénolamides sont en revanche clairement impliqués dans des processus de défense. Si on prend le cas de la caféoyl-putrescine, un des phénolamides qu'on retrouve chez la tomate, il a été montré qu'elle peut agir comme perturbateur de l'oviposition de la mouche mineuse *Liriomyza trifolii* chez le poivron (Tebayashi et al., 2007) mais aussi comme agent de répulsion lors de l'herbivorie des tissus de *Nicotiana attenuata* par des larves de *Manduca sexta* et *Spodoptera littoralis* (Alamgir et al., 2016; Kaur et al., 2010). Je dirige la rédaction d'un article de revue sur le sujet qui réunira plusieurs équipes de recherche françaises travaillant sur les phénolamides (Roumani et al., soumission 1er trismestre 2020).

Chez la tomate, l'accumulation de dérivés tyramine et de caféoyl putrescine en réponse à l'infection par la bactérie *Pseudomonas syringea* (Roepenack-Lahaye et al., 2003b; Royer et al., 2016), ainsi que la forte accumulation de caféoyl-putrescine et de dérivés spermine et spermidine en réponse à l'herbivorie de *Tuta absoluta* (Coqueret, 2017), suggèrent également une implication dans la défense. Cependant, cette implication doit être confirmée expérimentalement et le rôle des phénolamides dans d'autres processus doit aussi être exploré.

Ces questions constituent le cœur de la thèse de Marwa Roumani. Pour y répondre, nous utilisons une stratégie de génétique inverse qui tire bénéfice (i) des connaissances récemment acquises et en cours d'acquisition sur la description de la voie de biosynthèse de ces métabolites chez la tomate et (ii) du développement et de la démocratisation de l'outil d'édition de génome CRISPR/Cas 9. Marwa Roumani a acquis les compétences sur CRISPR/Cas 9 grâce à un séjour de 2 mois réalisé dans l'unité BFP du centre INRA de Bordeaux (Pr. Michel Hernould). Elle a mis à profit cette formation pour générer plusieurs mutants affectés pour l'expression de gènes PHT, mais également de gènes de régulation (facteurs de transcription) dans l'optique de diminuer l'accumulation de phénolamides individuels ou bien d'un ensemble et d'en étudier les conséquences sur la physiologie générale de la plante. L'année 2020 sera dédiée au phénotypage de ces plantes, en considérant l'impact des modifications sur les processus de croissance, de fertilité et de défense. Ce travail de phénotypage pourra s'appuyer sur plusieurs collaborations, comme l'ISA (A.V. Lavoir) pour la caractérisation de la résistance de ces plantes à *Tuta absoluta* mais aussi des partenaires universitaires de Lille (D. Gagneul) et Tours (S. Besseau) qui étudient l'évolution de la composition des phénolamides dans les fleurs.

5.3 Etude du compromis croissance défense chez les plantes

Contributeurs : D. Bevacqua (CR PSH), C. Charles (TR LAE), A. Fauvet (TR LAE), G. Galati (Doct. LAE 2015-2019, ATER 2019-2020), J. Grosjean (IE LAE), A. Hehn (Pr. LAE), R. Larbat (CR LAE), A-V. Lavoir (MCF ISA), J. Le Bot (CR PSH), A. Olry (IR LAE), C. Robin (DR LAE), M. Roumani (Doct. LAE 2018-2021), C. Villard (Doct. LAE, 2017-2020), X (Doct. LAE 2020-2023).

Je souhaite maintenir mon investissement dans le travail initié sur la modulation de la balance croissance-défense par la nutrition azotée en contribuant au développement d'un modèle de fonctionnement de la plante entière intégrant explicitement les voies métaboliques primaires et spécialisés. Ce travail intégratif permettra de mieux comprendre les réorganisations métaboliques engendrées par la réponse de la plante à une contrainte abiotique ou biotique, afin d'en évaluer les coûts et les bénéfices. Ce travail implique (1) le développement d'un modèle mécaniste de fonctionnement de la plante et (2) l'acquisition de

jeux de données supplémentaires sur des plantes dont les rapports métabolites primaires/métabolites spécialisés seront modifiés par ingénierie métabolique.

5.3.1 Modélisation mécaniste de l'acquisition et de la répartition des ressources entre croissance et défense

Contributeurs : D. Bevacqua (CR PSH), R. Larbat (CR LAE), A-V. Lavoir (MCF ISA), J. Le Bot (CR PSH), C. Robin (DR LAE), X (Doct. PSH 2020-2023 ?).

L'objectif ici est de construire un modèle mécaniste de la plante entière, qui intègre les réponses identifiées au cours de nos travaux passés, présents et futurs. Ce modèle sera constitué de plusieurs compartiments (feuille, tige, racine) et intégrera un ensemble de processus physiologiques de la plante : acquisition de carbone et d'azote, répartitions entre organes et entre les grandes voies du métabolisme impliqué dans la croissance, la défense et le stockage (de quelques heures à plusieurs jours après l'agression, avec prise en compte des cycles nycthéméraux, Fig. 30). Pour cela, nous pourrons nous appuyer sur le modèle conceptuel de répartition des ressources que nous avons mis au point en collaboration avec le Pr. Ruoff (Larbat et al., 2016), et sur des modèles développés par nos partenaires de l'unité PSH (Bevacqua et al., 2019) ou dans la communauté scientifique (Feller et al., 2015). La création du modèle sera portée par D. Bevacqua, modélisateur, qui pourra bénéficier des données acquises et en cours d'acquisition par notre équipe et l'unité ISA. Le début de ce travail dépend de notre capacité à obtenir une bourse de thèse (Bourse de thèse porté par D. Bevacqua demandée pour 2020).

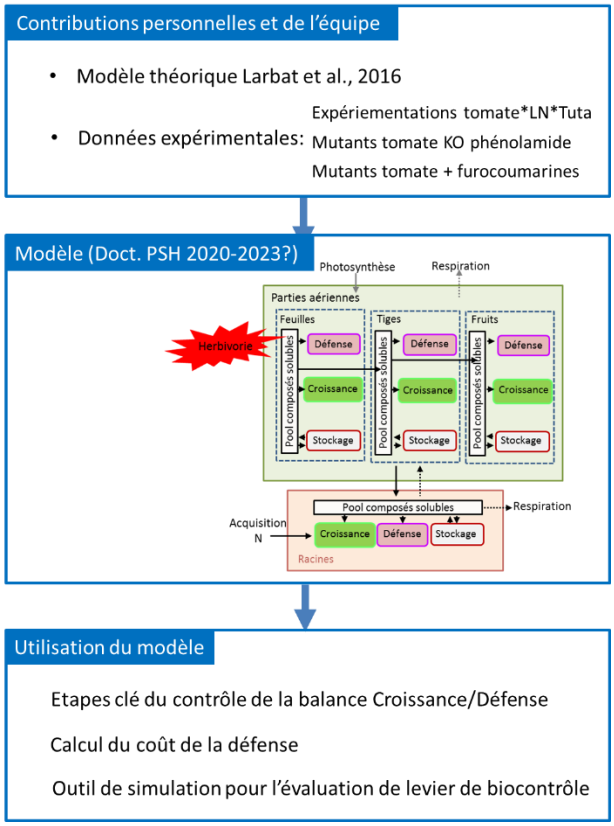


Figure 30 : Contributions, création et utilisation d'un modèle de répartition du carbone entre croissance et défense à l'échelle de la plante.
La construction du modèle sera portée par l'unité PSH (D. Bevacqua) au travers d'une thèse que nous contribuerons à encadrer. Ce modèle décrit les processus d'acquisition de ressources, leur distribution entre les différents organes de la plante et leur utilisation dans la croissance, la défense ou le stockage. Ce modèle pourra bénéficier du premier modèle théorique créé en 2016 (Larbat et al. 2016). Il bénéficiera d'un apport massif de données expérimentales acquis et en cours d'acquisition. Ce modèle sera ensuite un outil important pour l'ensemble des partenaires de ce projet, à la fois sur des questions fondamentales (identification d'étape clé contrôlant la balance croissance/défense, coût de la défense) et appliquées (évaluation de leviers de biocontrôle).

5.3.2 Modulation de voies métaboliques et effets sur le fonctionnement de la plante

Contributeurs : C. Charles (TR LAE), A. Fauvet (TR LAE), G. Galati (Doct. LAE 2015-2019, ATER 2019-2020), J. Grosjean (IE LAE), A. Hehn (Pr. LAE), M. Hernould (Pr. BFP), R. Larbat (CR LAE), A-V. Lavoir (MCF ISA), J. Le Bot (CR PSH), A. Olry (IR LAE), C. Robin (DR LAE), M. Roumani (Doct. LAE 2018-2021), C. Villard (Doct. LAE, 2017-2020), X (Doct. LAE 2020-2023).

Les avancées faites sur la connaissance de la voie de biosynthèse des furocoumarines et des phénolamides permettent de développer des outils originaux d'étude du compromis croissance/défense. Nous disposons désormais de l'intégralité des gènes permettant la synthèse de psoralène à partir de la phénylalanine. Le projet consiste à recréer la voie de biosynthèse menant au psoralène chez des plantes n'en possédant pas initialement, comme le tabac et la tomate. L'analyse des conséquences métaboliques et physiologiques de l'intégration de cette voie doit nous permettre de mieux comprendre les coûts (coût métabolique, coût d'allocation) liés à l'émergence d'un trait de défense.

Une première série de plants de tabac exprimant les deux premières enzymes de la voie (pour mener à la déméthylsubérosine) a été obtenue à la fin de la thèse de G. Galati (2015-2019). Ces plantes sont actuellement en cours d'analyse (G. Galati ATER 2019-2020). Un travail similaire est également en cours par l'intégration de l'ensemble des gènes de la voie chez la tomate (Thèse C. Villard, 2017-2020). Les plantes seront analysées à partir de 2020 (Thèse C. Villard 2017-2020 + Thèse X, 2020-2023). Ces analyses intègreront un ensemble de mesures (éco)-physiologiques (paramètres de croissance, échanges gazeux, résistance à des pathogènes et ravageurs) et métaboliques (suivi de pool métaboliques, analyses de répartitions de ressources) permettant de caractériser les conséquences de l'intégration d'une nouvelle voie de biosynthèse sur les principaux processus de fonctionnement de la plante (croissance/défense/fertilité).

En miroir de ces travaux, les plants de tomate modifiés pour l'accumulation en phénolamides (Point 5.2) seront également caractérisés sous l'angle du compromis croissance-défense.

Ces travaux seront pourvoyeurs de données expérimentales utilisables pour la création ou la validation du modèle décrit au point 5.3.1.

5.4 Etude spécifique des mécanismes de résistance de la tomate à *T. absoluta* en vue du développement de solutions de biocontrôle

Contributeurs : D. Bevacqua (CR PSH), A. Biondi (MCF, Univ Catania), B. Caromel (IR GAFL), C. Charles (TR LAE), C. Coutand (CR PSH), N. Desneux (DR ISA), A. Fauvet (TR LAE), J. Grosjean (IE LAE), F. Hilliou (IR ISA), A. Kergunteil (CR LAE), R. Larbat (CR LAE), A-V. Lavoir (MCF ISA), J. Le Bot (CR PSH), G. Le Goff (CR ISA) P. Nicot (DR PV), A. Olry (IR LAE), C. Robin (DR LAE), M. Roumani (Doct. LAE 2018-2021), M. Siegwart (IR PSH), S. Tortorici (Doct. Univ Catania 2018-2021), C. Villard (Doct. LAE 2017-2020), X (Doct. LAE 2020-2023), L. Zapalla (Pr. Univ Catania).

Initiée dès 2011 par le développement d'une collaboration avec l'unité ISA (Sophia-Antipolis), l'étude de l'interaction tomate-*Tuta absoluta* a ouvert la voie vers un axe de recherche finalisée autour du contrôle biologique d'un ravageur potentiellement dévastateur dont le contrôle repose encore largement sur l'usage de pesticides. Dans le contexte d'une diminution drastique voire totale de l'usage de pesticides de synthèse, le contrôle de *Tuta*

absoluta, comme d'une grande diversité de bioagresseurs, doit être revisité et de nouvelles solutions doivent être proposées. Le contrôle biologique implique un ensemble de pratiques (utilisation de biopesticides moins rémanents et à spectre d'action moins large que les pesticides de synthèse, contrôles biologiques par l'utilisation d'auxiliaires de cultures, associations de cultures pour contrôler les ravageurs au travers une optimisation des communications plantes/plantes et plantes/insectes…). En m'intéressant aux défenses naturelles développées par la plante et en étudiant différentes pratiques ou leviers agronomique pouvant les optimiser, je contribue avec mes partenaires à explorer la possibilité d'un contrôle des bioagresseurs par une approche dite « bottom-up ».

Dans le cas de *Tuta absoluta*, mes partenaires et moi avons montré que la fertilisation N peut être un levier efficace, réduisant le développement des larves (par un effet trophique et sans doute une stimulation des défenses constitutives). Par ailleurs, l'étude des défenses de la plante montre qu'en dépit d'une sensibilité à l'herbivorie de ce ravageur, la plante peut développer des mécanismes de défense (émission accrue de COV, accumulation de phénolamides, induction d'activités enzymatiques de défense). Par une analyse préliminaire consistant à déposer des larves de *Tuta absoluta* sur des plantes qui avait été préalablement infestées par ce même ravageur, nous avons montré que les défenses induites présentent une certaine efficacité, menant à une augmentation de la mortalité des larves nouvellement déposées.

A l'automne 2017, j'ai initié une réflexion avec nos partenaires établis (Unités PSH d'Avignon et ISA de Sophia-Antipolis) et de nouveaux collaborateurs (Entomologistes de l'Université de Catane, biologistes moléculaire du Leibnitz Institute de Halle et généticiens des plantes de l'Unité GAFL d'Avignon). L'objectif était de structurer un cadre de recherche définissant les principales questions scientifiques à explorer sur l'interaction tomate-*Tuta absoluta,* permettant ainsi d'être réactifs aux appels à projets. Cette initiative s'est concrétisée par le dépôt de quatre projets (2 nationaux, 2 européens) dont deux en tant que porteur. Deux projets n'ont pas été retenus pour financement (Insectom, appel commun ANR-DFG et Predator, appel européen ERANET Suscrop), un est en cours de réalisation (Projet INRA-EA Biotactique), un dernier vient d'être soumis (Appel PPR de l'ANR « Cultiver, protéger autrement » CapZéroPhyto). Les questions de recherches s'articulent autour de deux axes qui seront décrites ci-dessous.

5.4.1 Etude des défenses endogènes de la plante et de leur stimulation par le priming et par la disponibilité en azote

Cet axe de recherche est actuellement prospecté au travers du projet Biotactique (Projet inter-unité financé par le département EA de l'INRA) que je porte et qui a débuté en mars 2019, pour une durée de 3 ans.

Un premier objectif est de déterminer quelle(s) voie(s) de défense activées par le plant de tomate sont les plus efficaces sur *Tuta absoluta*. Pour cela nous utilisons une approche de génétique inverse qui consiste à générer différentes lignées de tomate dont l'accumulation en métabolites/enzymes de défense sera inhibée ou augmentée, puis étudier leur sensibilité à l'herbivorie de ce ravageur. Parmi les mutants, nous disposons de ceux générés par M. Roumani, déficients dans l'accumulation de phénolamides. D'autres mutants déficients dans l'accumulation d'autres métabolites spécialisés (glycoalcaloïdes, acide chlorogénqiue) et de protéines de défense (PPO, pepetides inhibiteurs de protéase) sont en cours de génération.

Le second objectif de ce projet est d'étudier l'efficacité de l'utilisation du levier azote sur un cycle complet de culture couvrant une période de 6 mois. Pendant cette période, nous infesterons les plantes élevées sur différents niveaux d'azote de manière répétée avec les générations successives d'insecte. Le cycle de vie de *Tuta absoluta* étant d'environ 30 jours, nous pouvons espérer 5 à 6 générations de larves. Cette étude sur une longue période nous permettra de caractériser (i) les conséquences d'épisodes d'herbivorie successifs sur les capacités de défense de la plante, (ii) l'impact de la nutrition sur la balance entre bénéfices d'une meilleures résistance et coûts en terme de croissance et de rendement en fruit, (iii) les capacités de détoxification de l'insecte et (iv) l'évolution de ces capacités sur plusieurs générations.

5.4.2 Importance de la génétique dans la résistance à *Tuta absoluta* et la réponse à des leviers agronomiques de biocontrôle.

Cet axe de recherche est envisagé dans le cadre du projet CapZéroPhyto (réponse AAP PPR « Cultiver, Protéger autrement ») qui vient d'être soumis et dans lequel nous sommes partenaires. L'objectif général du projet CapZéroPhyto, est d'évaluer l'efficacité de différents leviers de biocontrôle et de leur interaction pour la protection de cultures maraichères et de vergers vis-à-vis d'un large panel de bioagresseurs. Ce projet intègre un grand consortium de partenaires académiques, associatifs et privés.

Dans ce projet, une action de recherche que je souhaite développer porte sur la caractérisation d'une résistance génétique à l'herbivorie de *Tuta absoluta.* La résistance aux ravageurs a été relativement peu étudiée, notamment chez la tomate, certainement parce que c'est un trait multifactoriel complexe, mais aussi car la mise en place d'expérimentations adaptées est délicate (grand nombre de plantes à gérer en présence d'insectes). La tomate de culture (*S. lycopersicum*) est sensible à *Tuta absoluta*. Néanmoins, certaines espèces sauvages voisines (*S. habrochaïtes*, *S. galapagense*…) présentent une résistance à ce ravageur. L'objectif de ce projet que je mènerai avec des collègues généticiens (GAFL Avignon) et entomologistes (ISA Sophia Antipolis) dans le cadre de la co-direction d'une thèse, consiste à rechercher des QTL de résistance dans une population interspécifique issue du croisement d'un individu sensible et d'un individu résistant. Cette population de 150 à 200 individus sera phénotypée pour sa résistance à *Tuta absoluta* (résistance à l'herbivorie, attraction/répulsion des adultes…) et les QTL de résistance seront positionnés sur le génome. En parallèle, ces individus seront caractérisés pour leur accumulation en métabolites spécialisés (niveau constitutif et induits). Les QTL d'accumulation en métabolite spécialisés seront également positionnés sur le génome et leur position sera comparée à celle des QTL de résistance. Cette approche permettra d'évaluer la part du métabolisme spécialisé dans les processus de résistance à *Tuta absoluta* et de fournir des marqueurs de résistance pour la sélection de variétés.

5.5 Evaluation des activités thérapeutiques de métabolites spécialisés de plantes

Contributeurs : M. Boisbrun (MCF L2CM), R. Duval (Pr. L2CM), R. Larbat (CR LAE), C. Paris (IR LIBio), A. Risler (IR L2CM), C. Robin (DR LAE), A. Ropars (MCF, SIMPA), M. Roumani (Doct. LAE 2018-2021), B. Simard (TR LIBio).

Les travaux portant sur l'interaction tomate-*Tuta absoluta* ont révélé l'accumulation dans les plantes infestées de phénolamides rares (dérivées spermine et spermidine) dont la

structure est très proche de phénolamides à forte activité thérapeutique (kukoamine A et B) (Abe et al., 2017; Wang et al., 2016; Hadjipavlou-Litina et al., 2009). Fort de cette découverte fin 2017, j'ai décidé d'intégrer dans mes questions de recherche le criblage des activités biologiques de ces métabolites. J'ai ainsi créé un consortium intégrant biologistes des plantes, biochimistes, chimistes et pharmacologues spécialisés dans les problématiques de maladies inflammatoires, maladies nosocomiales et cancers pour monter un projet intégrant la production, la purification et le criblage fonctionnel de phénolamides.

Pour la construction de ce projet, j'ai bénéficié d'un contexte local favorable au travers de l'émergence du projet i-Site Lorraine Université d'Excellence (LUE) dont un axe fort porte sur l'identification de nouvelles biomolécules à activité anti-inflammatoire et anti-prolifération (Programme Impact Biomolécules). Le projet que je porte depuis l'automne 2018, soutenu à hauteur de 20k€ par LUE, est dans sa phase opérationnelle. Dans la cadre de la thèse de M. Roumani, nous avons défini les conditions optimales pour l'accumulation des phénolamides d'intérêt par les plants de tomate infestés par *T. absoluta* (âge de plantes, durée d'infestation). Avec le Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), nous avons défini une méthode de séparation et de purification de ces métabolites par HPLC semi-préparative. Une première série de criblage d'activités antibactériennes a été réalisée sur la plateforme AntiBacterial Chemistry (ABC) du Laboratoire Lorrain de Chimie Moléculaire (L2CM) indiquant de faibles activités pour les métabolites testés. En revanche, le criblage d'activités anti-inflammatoires que nous avons réalisé avec le laboratoire Stress Immunité Pathogène (SIMPA) a révélé des activités intéressantes pour certains métabolites, qui amènent à une caractérisation plus poussée.

Ce projet se poursuivra en 2020 par le criblage d'activités antiprolifératives sur cellules tumorales et la poursuite des criblages d'activité antibactérienne et anti-inflammatoire sur de nouveaux phénolamides purifiés. L'intégration récente d'un chimiste dans notre consortium (M. Boisbrun, L2CM) est un plus qui nous permet d'envisager la synthèse chimique et le criblage d'activité y compris pour des métabolites présents en trop faible quantité dans les plants de tomate infestés. Par ailleurs, au vu des premiers résultats sur les activités anti-inflammatoires, nous envisageons déjà de développer une approche structure-fonction par la mesure d'activité de métabolites de synthèse dérivés des métabolites naturels les plus actifs que nous avons identifiés afin de définir quelle(s) structure(s) chimique(s) explique(nt) leur bioactivité.

Cette question de recherche autour de l'évaluation des propriétés thérapeutiques des phénolamides est donc bien amorcée, portée par un consortium de recherche local, dynamique et complémentaire. Elle s'intègre dans un des axes stratégiques de l'équipe autour de la valorisation non alimentaire du végétal. L'ambition sera de pérenniser ce consortium par l'obtention de projets de plus grande envergure.

6 Conclusions

Le métabolisme spécialisé des plantes est un sujet d'étude fascinant et infini de par la multiplicité des façons dont il peut être abordé. L'ethnopharmacologue s'extasiera devant la diversité des structures et fonctions biologiques de ces métabolites, que le chimiste considérera comme une source d'inspiration ou un défi cognitif. Le physiologiste se demandera « comment est générée cette diversité ? », tandis que l'éco-physiologiste et l'écologue se demanderont « à quoi ça sert ? »

En tant qu'outil de communication entre les plantes et leur environnement, le métabolisme spécialisé pourrait s'apparenter à une langue dont nous ne comprenons pour l'heure que quelques mots. Le travail résumé dans ce document aura modestement contribué à mieux comprendre certaines « expressions » et comment elles sont utilisées dans des situations particulières de contraintes biotiques et abiotiques. Le travail est encore long pour comprendre la signification de chacun de ses mots et les nouveaux outils d'édition de génome, permettant d'inactiver « facilement » des voies de biosynthèse bien précises, pourraient en quelque sorte constituer une « Pierre de Rosette » moderne.

Un enjeu majeur de la compréhension du métabolisme spécialisé est de mobiliser ces connaissances pour élaborer des stratégies de gestion durable des bioagresseurs. Cet objectif ambitieux et nécessaire, qui constituera une priorité de mes recherches, pourra être atteint par une prise en compte multi-échelle du système de culture considéré et une approche pluri-disciplinaire intégrant entre autres, écologues, agriculteurs, agronomes, (éco)-physiologistes et sociologues.

7 Bibliographie

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.

Abegaz, B.M., Ngadjui, B.T., Folefoc, G.N., Fotso, S., Ambassa, P., Bezabih, M., Dongo, E., Rise, F., and Petersen, D. (2004). Prenylated flavonoids, monoterpenoid furanocoumarins and other constituents from the twigs of Dorstenia elliptica (Moraceae). Phytochemistry **65**: 221–226.

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 Environ. **39**: 453–466.

Albrecht, T. and Argueso, C.T. (2017). Should I fight or should I grow now? The role of cytokinins in plant growth and immunity and in the growth–defence trade-off. Ann. Bot. **119**: 725–735.

Athnasios, A.K., El-Kholy, I.E.-S., Soliman, G., Shaban, M.A.M., Bell, F., Cadogan, J.I.G., Corfield, G., Cortés, M.L., Chuchani, G., and Evans, R.F. (1962). Constituents of leaves of Ficus carica, l .1. Isolation of psoralen, bergapten, psi-taraxasterol, and beta-sitosterol. J. Chem. Soc. Resumed: 4253–4264.

Backer, L.D., Bawin, T., Schott, M., Gillard, L., Markó, I.E., Francis, F., and Verheggen, F. (2017). Betraying its presence: identification of the chemical signal released by <Emphasis Type="Italic">Tuta absoluta</Emphasis>-infested tomato plants that guide generalist predators toward their prey. Arthropod-Plant Interact. **11**: 111–120.

Backer, L.D., Megido, R.C., Fauconnier, M.-L., Brostaux, Y., Francis, F., and Verheggen, F. (2015). <Emphasis Type="Italic">Tuta absoluta</Emphasis>-induced plant volatiles: attractiveness towards the generalist predator <Emphasis Type="Italic">Macrolophus pygmaeus</Emphasis>. Arthropod-Plant Interact. **9**: 465–476.

Bassard, J.-E., Ullmann, P., Bernier, F., and Werck-Reichhart, D. (2010). Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. Phytochemistry **71**: 1808–1824.

Behmer, S.T. (2008). Insect Herbivore Nutrient Regulation. Annu. Rev. Entomol. **54**: 165–187.

Bekaert, M., Edger, P.P., Hudson, C.M., Pires, J.C., and Conant, G.C. (2012). Metabolic and evolutionary costs of herbivory defense: systems biology of glucosinolate synthesis. New Phytol. **196**: 596–605.

Berenbaum, M. and Feeny, P. (1981). Toxicity of Angular Furanocoumarins to Swallowtail Butterflies: Escalation in a Coevolutionary Arms Race? Science **212**: 927–929.

Bevacqua, D., Génard, M., Lescourret, F., Martinetti, D., Vercambre, G., Valsesia, P., and Mirás-Avalos, J.M. (2019). Coupling epidemiological and tree growth models to control fungal diseases spread in fruit orchards. Sci. Rep. **9**.

Bienz, S., Bisegger, P., Guggisberg, A., and Hesse, M. (2005). Polyamine alkaloids. Nat. Prod. Rep. **22**: 647–658.

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.

Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., and Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Phytochem. Rev. **5**: 293–308.

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z.B., and Eck, J.V. (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.

Brown, S.A. and Steck, W. (1973). 7-Demethylsuberosin and osthenol as intermediates in furanocoumarin biosynthesis. Phytochemistry **12**: 1315–1324.

Bryant, J.P., Chapin, F.S., and Klein, D.R. (1983). Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. Oikos **40**: 357–368.

Campos, L., Lisón, P., López-Gresa, M.P., Rodrigo, I., Zacarés, 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. Mol. Plant. Microbe Interact. **27**: 1159–1169.

Campos, Marcelo, Yoshida, Yuki, Major, Ian T, and Dalton, de Oliveira Ferreira (2016). Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs | Nature Communications.

Campos, M.R., Biondi, A., Adiga, A., Guedes, R.N.C., and Desneux, N. (2017). From the Western Palaearctic region to beyond: <Emphasis Type="Italic">Tuta absoluta</Emphasis> 10 years after invading Europe. J. Pest Sci. **90**: 787–796.

Caporale, G., Dall'Acqua, F., Marciani, S., and Capozzi, A. (1970). Studies on the Biosynthesis of Psoralen and Bergapten in the Leaves of Ficus carica. Z. Für Naturforschung B **25**: 700–703.

Caporale, G., Innocenti, G., Guiotto, A., Rodighiero, P., and Dall'Acqua, F. (1981a). Biogenesis of linear O-alkylfuranocoumarins: A new pathway involving 5-hydroxymarmesin. Phytochemistry **20**: 1283–1287.

Caporale, G., Innocenti, G., Guitto, A., Rodighiero, P., and Dall'Acqua, F. (1981b). Biogenesis of linear O-alkylfuranocoumarins: a new pathway involving 5-hydroxymarmesin. Phytochemistry **20**: 1283–1287.

Cates, R.G., Henderson, C.B., and Redak, R.A. (1987). Responses of the western spruce budworm to varying levels of nitrogen and terpenes. Oecologia **73**: 312–316.

Chang, A., Lim, M.-H., Lee, S.-W., Robb, E.J., and Nazar, R.N. (2008). Tomato Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family, Highly Redundant but Strongly Underutilized. J. Biol. Chem. **283**: 33591–33601.

Chiang, C.-C., Cheng, M.-J., Peng, C.-F., Huang, H.-Y., and Chen, I.-S. (2010). A Novel Dimeric Coumarin Analog and Antimycobacterial Constituents from Fatoua pilosa. Chem. Biodivers. **7**: 1728–1736.

Cochrane, F.C., Davin, L.B., and Lewis, N.G. (2004). The Arabidopsis phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. Phytochemistry **65**: 1557–1564.

Dall'Acqua, F., Innocenti, G., Caporale, G., Rodighiero, P., and Guiotto, A. (1979). The Role of 5-Hydroxymarmesin in the Biogenesis of Bergapten. Z. Für Naturforschung C **34**: 1278–1280.

Dall'Acqua, F. and Martelli, P. (1991). Photosensitizing action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events. J. Photochem. Photobiol. B **8**: 235–254.

Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., and Meyer, C. (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. Annu. Rev. Plant Biol. **67**: 261–285.

Dobrenel, T., Marchive, C., Sormani, R., Moreau, M., Mozzo, M., Montané, M.-H., Menand, B., Robaglia, C., and Meyer, C. (2011). Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. Biochem. Soc. Trans. **39**: 477–481.

Douglas, C., Hoffmann, H., Schulz, W., and Hahlbrock, K. (1987). Structure and elicitor or u.v.-light-stimulated expression of two 4-coumarate:CoA ligase genes in parsley. EMBO J. **6**: 1189–1195.

Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y., and Bourgaud, F. (2013). Coumarin and Furanocoumarin Quantitation in Citrus Peel via Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (UPLC-MS). J. Agric. Food Chem. **61**: 10677–10684.

El-Awaad, I., Bocola, M., Beuerle, T., Liu, B., and Beerhues, L. (2016). Bifunctional CYP81AA proteins catalyse identical hydroxylations but alternative regioselective phenol couplings in plant xanthone biosynthesis. Nat. Commun. **7**: 11472.

Estiarte, M., Filella, I., Serra, J., and Peñuelas, J. (1994). Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivoreHelicoverpa armigera (Hubner). Oecologia **99**: 387–391.

Feller, C., Favre, P., Janka, A., Zeeman, S.C., Gabriel, J.-P., and Reinhardt, D. (2015). Mathematical Modeling of the Dynamics of Shoot-Root Interactions and Resource Partitioning in Plant Growth. PLOS ONE **10**: e0127905.

Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., and Stitt, M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. Plant J. **46**: 533–548.

Gambichler, T., Breuckmann, F., Boms, S., Altmeyer, P., and Kreuter, A. (2005). Narrowband UVB phototherapy in skin conditions beyond psoriasis. J. Am. Acad. Dermatol. **52**: 660–670.

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.

Geiger, M., Haake, V., Ludewig, F., Sonnewald, U., and Stitt, M. (1999). The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. Plant Cell Environ. **22**: 1177–1199.

Gershenzon, J. (1994). Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. J. Chem. Ecol. **20**: 1281–1328.

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.

Glynn, C., Herms, D.A., Orians, C.M., Hansen, R.C., and Larsson, S. (2007). Testing the growth–differentiation balance hypothesis: dynamic responses of willows to nutrient availability. New Phytol. **176**: 623–634.

Godard, K.-A., White, R., and Bohlmann, J. (2008). Monoterpene-induced molecular responses in Arabidopsis thaliana. Phytochemistry **69**: 1838–1849.

Grienenberger, 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. Plant J. **58**: 246–259.

Guedes, R.N.C. and Picanço, M.C. (2012). The tomato borer Tuta absoluta in South America: pest status, management and insecticide resistance. EPPO Bull. **42**: 211–216.

Guitart, J. (2019). Psoralen Plus UV-A Therapy in the 21st Century: Use It or Lose It. JAMA Dermatol. **155**: 529–531.

Gravot, A. (2002). Étude de P450s impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens*

Guo, Q., Major, I.T., and Howe, G.A. (2018). Resolution of growth–defense conflict: mechanistic insights from jasmonate signaling. Curr. Opin. Plant Biol. **44**: 72–81.

Hadjipavlou-Litina, D., Garnelis, T., Athanassopoulos, C.M., and Papaioannou, D. (2009). Kukoamine A analogs with lipoxygenase inhibitory activity. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. **24**: 1188–1193.

Halitschke, R., Stenberg, J.A., Kessler, D., Kessler, A., and Baldwin, I.T. (2008). Shared signals –'alarm calls' from plants increase apparency to herbivores and their enemies in nature. Ecol. Lett. **11**: 24–34.

Hamerski, D. and Matern, U. (1988a). Biosynthesis of psoralens Psoralen 5-monooxygenase activity from elicitor-treated Ammi majus cells. FEBS Lett. **239**: 263–265.

Hamerski, D. and Matern, U. (1988b). Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in Ammi majus L. suspension cultures. Eur. J. Biochem. **171**: 369–375.

Han, P., Desneux, N., Becker, C., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., Zhang, J., and Lavoir, A.-V. (2018). Bottom-up effects of irrigation, fertilization and plant resistance on Tuta absoluta: implications for Integrated Pest Management. J. Pest Sci.

Hehmann, M., Lukačin, R., Ekiert, H., and Matern, U. (2004). Furanocoumarin biosynthesis in Ammi majus L. Eur. J. Biochem. **271**: 932–940.

Herms, D.A. and Mattson, W.J. (1992). The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. Q. Rev. Biol. **67**: 283–335.

Herrmann, K. and Nagel, C.W. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **28**: 315–347.

Hoffland, E., van Beusichem, M.L., and Jeger, M.J. (1999). Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to Botrytis cinerea. Plant Soil **210**: 263–272.

Hoffland, E., Dicke, M., Van Tintelen, W., Dijkman, H., and Van Beusichem, M.L. (2000a). Nitrogen Availability and Defense of Tomato Against Two-spotted Spider Mite. J. Chem. Ecol. **26**: 2697–2711.

Hoffland, E., Jeger, M.J., and van Beusichem, M.L. (2000b). Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. Plant Soil **218**: 239–247.

Huang, Y., Drengstig, T., and Ruoff, P. (2012). Integrating fluctuating nitrate uptake and assimilation to robust homeostasis. Plant Cell Environ. **35**: 917–928.

Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L., and He, S.Y. (2014). Growth–Defense Tradeoffs in Plants: A Balancing Act to Optimize Fitness. Mol. Plant **7**: 1267–1287.

Innocenti, G., Bettero, A., and Caporale, G. (1982). Determination of the coumarinic constituents of Ficus carica leaves by HPLC. Il Farm. Ed. Sci. **37**: 475–485.

Islam, M.N., Hasanuzzaman, A.T.M., Zhang, Z.-F., Zhang, Y., and Liu, T.-X. (2017). High Level of Nitrogen Makes Tomato Plants Releasing Less Volatiles and Attracting More Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). Front. Plant Sci. **8**.

Jiang, T., Zhai, H., Wang, F., Yang, N., Wang, B., He, S., and Liu, Q. (2013). Cloning and characterization of a carbohydrate metabolism-associated gene IbSnRK1 from sweetpotato. Sci. Hortic. **158**: 22–32.

Jimenez-Aleman, G.H., Machado, R.A.R., Baldwin, I.T., and Boland, W. (2017). JA-Ile-macrolactones uncouple growth and defense in wild tobacco. Org. Biomol. Chem. **15**: 3391–3395.

Jones, C.G. and Hartley, S.E. (1999). A Protein Competition Model of Phenolic Allocation. Oikos **86**: 27–44.

Junttila, O. (1976). Allelopathic Inhibitors in Seeds of Hevacleum laciniatum. Physiol. Plant. **36**: 374–378.

Karamat, F., Olry, A., Munakata, R., Koeduka, T., Sugiyama, A., Paris, C., Hehn, A., Bourgaud, F., and Yazaki, K. (2014). A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. Plant J. **77**: 627–638.

Karasov, T.L., Chae, E., Herman, J.J., and Bergelson, J. (2017). Mechanisms to Mitigate the Trade-Off between Growth and Defense. Plant Cell Online **29**: 666–680.

Kaur, H., Heinzel, N., Schöttner, M., Baldwin, I.T., and Gális, 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.

Kellner, S. (2008). Molekulare und biochemische aspekte der furanocumarin biosynthese in *Ammi majus,* L.

Kitajima, S. et al. (2018). Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (Ficus carica). Planta.

Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E., and Keinänen, M. (1998). Regulation of Woody Plant Secondary Metabolism by Resource Availability: Hypothesis Testing by Means of Meta-Analysis. Oikos **83**: 212–226.

Krieger, C., Roselli, S., Kellner-Thielmann, S., Galati, G., Schneider, B., Grosjean, J., Olry, A., Ritchie, D., Matern, U., Bourgaud, F., and Hehn, A. (2018). The CYP71AZ P450 Subfamily: A Driving Factor for the Diversification of Coumarin Biosynthesis in Apiaceous Plants. Front. Plant Sci. **9**.

Kröner, A., Marnet, N., Andrivon, D., and Val, F. (2012). Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. Plant Physiol. Biochem. **57**: 23–31.

Larbat, R. (2006). Contribution à l'étude des cytochromes P450 impliqués dans la voie de biosynthèse des furocoumarines.

Larbat, R., Bot, J.L., Bourgaud, F., Robin, C., and Adamowicz, S. (2012a). Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation. Plant Biol. **14**: 760–769.

Larbat, R., Hehn, A., Hans, J., Schneider, S., Jugdé, H., Schneider, B., Matern, U., and Bourgaud, F. (2009). Isolation and Functional Characterization of CYP71AJ4 Encoding for the First P450 Monooxygenase of Angular Furanocoumarin Biosynthesis. J. Biol. Chem. **284**: 4776–4785.

Larbat, R., Kellner, S., Specker, S., Hehn, A., Gontier, E., Hans, J., Bourgaud, F., and Matern, U. (2007). Molecular Cloning and Functional Characterization of Psoralen Synthase, the First Committed Monooxygenase of Furanocoumarin Biosynthesis. J. Biol. Chem. **282**: 542–554.

Larbat, R., Olsen, K.M., Slimestad, R., Løvdal, T., Bénard, C., Verheul, M., Bourgaud, F., Robin, C., and Lillo, C. (2012b). Influence of repeated short-term nitrogen limitations on leaf phenolics metabolism in tomato. Phytochemistry **77**: 119–128.

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 Sci. **224**: 62–73.

Larbat, R., Robin, C., Lillo, C., Drengstig, T., and Ruoff, P. (2016a). Modeling the diversion of primary carbon flux into secondary metabolism under variable nitrate and light/dark conditions. J. Theor. Biol. **402**: 144–157.

Larbat, R., Adamowicz, S., Robin, C., Han, P., Desneux, N., Le Bot, J. (2016b). Interrelated responses of tomato plants and the leaf miner *Tuta absoluta* to nitrogen supply. *Plant Biology, **18**, 495-504*

Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. In Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes, K.G. Ramawat and J.-M. Mérillon, eds (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg), pp. 1543–1580.

Le Bot, J., Bénard, C., Robin, C., Bourgaud, F., and 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. J. Exp. Bot. **60**: 4301–4314.

Lecompte, F., Abro, M.A., and Nicot, P.C. (2010). Contrasted responses of Botrytis cinerea isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. Plant Pathol. **59**: 891–899.

Lee, G., Joo, Y., Kim, S.-G., and Baldwin, I.T. (2017). What happens in the pith stays in the pith: tissue-localized defense responses facilitate chemical niche differentiation between two spatially separated herbivores. Plant J. **92**: 414–425.

Leiss, K.A., Maltese, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R., and Klinkhamer, P.G.L. (2009). Identification of Chlorogenic Acid as a Resistance Factor for Thrips in Chrysanthemum. Plant Physiol. **150**: 1567–1575.

Liu, C.-J., Huhman, D., Sumner, L.W., and Dixon, R.A. (2003). Regiospecific hydroxylation of isoflavones by cytochrome P450 81E enzymes from Medicago truncatula. Plant J. **36**: 471–484.

Loader, C. and Damman, H. (1991). Nitrogen Content of Food Plants and Vulnerability of Pieris Rapae to Natural Enemies. Ecology **72**: 1586–1590.

Loomis, W.E. (1932). Growth-differentiation balance vs. carbohydrate-natrigen ratio. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. **29**: 240–245.

Lu, Y., Gehan, J.P., and Sharkey, T.D. (2005). Daylength and Circadian Effects on Starch Degradation and Maltose Metabolism. Plant Physiol. **138**: 2280–2291.

Luo, J., Fuell, C., Parr, A., Hill, L., Bailey, P., Elliott, K., Fairhurst, S.A., Martin, C., and Michael, A.J. (2009). A Novel Polyamine Acyltransferase Responsible for the Accumulation of Spermidine Conjugates in Arabidopsis Seed. Plant Cell **21**: 318–333.

Machado, R.A.R., Baldwin, I.T., and Erb, M. (2017). Herbivory-induced jasmonates constrain plant sugar accumulation and growth by antagonizing gibberellin signaling and not by promoting secondary metabolite production. New Phytol. **215**: 803–812.

Mamoucha, S., Fokialakis, N., and Christodoulakis, N.S. (2016). Leaf structure and histochemistry of Ficus carica (Moraceae), the fig tree. Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants **218**: 24–34.

Margalha, L., Confraria, A., and Baena-González, E. (2019). SnRK1 and TOR: modulating growth–defense trade-offs in plant stress responses. J. Exp. Bot. **70**: 2261–2274.

Marrelli, M., Menichini, F., Statti, G.A., Bonesi, M., Duez, P., Menichini, F., and Conforti, F. (2012). Changes in the phenolic and lipophilic composition, in the enzyme inhibition and antiproliferative activity of Ficus carica L. cultivar Dottato fruits during maturation. Food Chem. Toxicol. **50**: 726–733.

Martin-Tanguy, J., Cabanne, F., Perdrizet, E., and Martin, C. (1978). The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. Phytochemistry **17**: 1927–1928.

Massot, B. (2001). Etude de la production de furocoumarines linéaires par des cultures *in vitro* de *Ruta graveolens*, L.

McKey, D. (1974). Adaptive Patterns in Alkaloid Physiology. Am. Nat. **108**: 305–320.

Milesi, S. (2001) Etude de la production de furocoumarines par la rue officinale (*Ruta graveolens*, L.): cultures de plantes au champ et culture *in vitro*.

Misra, P., Pandey, A., Tiwari, M., Chandrashekar, K., Sidhu, O.P., Asif, M.H., Chakrabarty, D., Singh, P.K., Trivedi, P.K., Nath, P., and Tuli, R. (2010). Modulation of Transcriptome and Metabolome of Tobacco by Arabidopsis Transcription Factor, AtMYB12, Leads to Insect Resistance. Plant Physiol. **152**: 2258–2268.

Moraes, C.M.D., Mescher, M.C., and Tumlinson, J.H. (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. Nature **410**: 577–580.

Munakata, R. et al. (2019). Convergent evolution of the UbiA prenyltransferase family underlies the independent acquisition of furanocoumarins in plants. New Phytol.

Munakata, R. et al. (2016). Molecular evolution of parsnip (Pastinaca sativa) membrane-bound prenyltransferases for linear and/or angular furanocoumarin biosynthesis. New Phytol. **211**: 332–344.

Musajo, L., Rodighiero, G., Breccia, A., Dall'Acqua, F., and Malesani, G. (1966). Skin-Photosensitizing Furocoumarins: Photochemical Interaction Between Dna and —O14ch3 Bergapten (5-Methoxy-Psoralen). Photochem. Photobiol. **5**: 739–745.

Nakayasu, M., Shioya, N., Shikata, M., Thagun, C., Abdelkareem, A., Okabe, Y., Ariizumi, T., Arimura, G., Mizutani, M., Ezura, H., Hashimoto, T., and Shoji, T. (2018). JRE4 is a master transcriptional regulator of defense-related steroidal glycoalkaloids in tomato. Plant J. **94**: 975–990.

Nguyen, P.M. and Niemeyer, E.D. (2008). Effects of Nitrogen Fertilization on the Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Basil (Ocimum basilicum L.). J. Agric. Food Chem. **56**: 8685–8691.

Niggeweg, R., Michael, A.J., and Martin, C. (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. Nat. Biotechnol. **22**: 746–754.

Olsen, K.M., Lea, U.S., Slimestad, R., Verheul, M., and Lillo, C. (2008). Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis. J. Plant Physiol. **165**: 1491–1499.

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 Physiol. **158**: 389–407.

Ono, E., Murata, J., Toyonaga, H., Nakayasu, M., Mizutani, M., Yamamoto, M.P., Umezawa, T., and Horikawa, M. (2018). Formation of a Methylenedioxy Bridge in (+)-Epipinoresinol by CYP81Q3 Corroborates with Diastereomeric Specialization in Sesame Lignans. Plant Cell Physiol. **59**: 2278–2287.

Pichersky, E. and Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. Curr. Opin. Plant Biol. **5**: 237–243.

Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., and Urban, P. (1996). [6] Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. In Methods in Enzymology, E.F. Johnson and M.R. Waterman, eds, Cytochrome P450, Part B. (Academic Press), pp. 51–64.

Popper, Z.A., Michel, G., Herve, C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T., Tuohy, M.G., Kloareg, B., and Stengel, D.B. (2011). Evolution and Diversity of Plant Cell Walls: From Algae to Flowering Plants. In Annual Review of Plant Biology, Vol 62, S.S. Merchant, W.R. Briggs, and D. Ort, eds (Annual Reviews: Palo Alto), pp. 567–588.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., and Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. Angew. Chem. Int. Ed. **50**: 586–621.

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. Sci. Agric. **63**: 20–25.

Roditakis, E., Vasakis, E., García-Vidal, L., del Rosario Martínez-Aguirre, M., Rison, J.L., Haxaire-Lutun, M.O., Nauen, R., Tsagkarakou, A., and Bielza, P. (2018). A four-year survey on insecticide resistance and likelihood of chemical control failure for tomato leaf miner Tuta absoluta in the European/Asian region. J. Pest Sci. **91**: 421–435.

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. (2003a). p-Coumaroylnoradrenaline, a Novel Plant Metabolite Implicated in Tomato Defense against Pathogens. J. Biol. Chem. **278**: 43373–43383.

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. (2003b). p-Coumaroylnoradrenaline, a Novel Plant Metabolite Implicated in Tomato Defense against Pathogens. J. Biol. Chem. **278**: 43373–43383.

Rohde, J., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2001). The TOR Kinases Link Nutrient Sensing to Cell Growth. J. Biol. Chem. **276**: 9583–9586.

Roselli, S., Olry, A., Vautrin, S., Coriton, O., Ritchie, D., Galati, G., Navrot, N., Krieger, C., Vialart, G., Bergès, H., Bourgaud, F., and Hehn, A. (2017). A bacterial artificial chromosome (BAC) genomic approach reveals partial clustering of the furanocoumarin pathway genes in parsnip. Plant J. **89**: 1119–1132.

Rostami, E., Madadi, H., Abbasipour, H., Allahyari, H., and Cuthbertson, A.G.S. (2017). Life table parameters of the tomato leaf miner Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae) on different tomato cultivars. J. Appl. Entomol. **141**: 88–96.

Rovinski, J.M. and Sneden, A.T. (1984). Furanocoumarins from Maquira calophylla. J. Nat. Prod. **47**: 557–557.

Rowen, E., Gutensohn, M., Dudareva, N., and Kaplan, I. (2017). Carnivore Attractant or Plant Elicitor? Multifunctional Roles of Methyl Salicylate Lures in Tomato Defense. J. Chem. Ecol. **43**: 573–585.

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 Sci. **244**: 57–67.

Royer, M., Larbat, R., Le Bot, J., Adamowicz, S., and Robin, C. (2013). Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato? Phytochemistry **88**: 25–33.

Rubio-Wilhelmi, M. del M., Sanchez-Rodriguez, E., Leyva, R., Blasco, B., Romero, L., Blumwald, E., and Ruiz, J.M. (2012). Response of carbon and nitrogen-rich metabolites to nitrogen deficiency in PSARK::IPT tobacco plants. Plant Physiol. Biochem. **57**: 231–237.

Scheible, W.-R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M.K., and Stitt, M. (2004). Genome-Wide Reprogramming of Primary and Secondary Metabolism, Protein Synthesis, Cellular Growth Processes, and the Regulatory Infrastructure of Arabidopsis in Response to Nitrogen. Plant Physiol. **136**: 2483–2499.

Schilmiller, A.L., Stout, J., Weng, J.-K., Humphreys, J., Ruegger, M.O., and Chapple, C. (2009). Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis. Plant J. **60**: 771–782.

Schoonhoven, L.M., Loon, B.V., Loon, J.J.A. van, and Dicke, M. (2005). Insect-Plant Biology (OUP Oxford).

Serapiglia, M.J., Minocha, R., and Minocha, S.C. (2008). Changes in polyamines, inorganic ions and glutamine synthetase activity in response to nitrogen availability and form in red spruce (Picea rubens). Tree Physiol. **28**: 1793–1803.

Silva, D.B., Weldegergis, B.T., Loon, J.J.A.V., and Bueno, V.H.P. (2017). Qualitative and Quantitative Differences in Herbivore-Induced Plant Volatile Blends from Tomato Plants Infested by Either Tuta absoluta or Bemisia tabaci. J. Chem. Ecol. **43**: 53–65.

Smirnova, E., Marquis, V., Poirier, L., Aubert, Y., Zumsteg, J., Menard, R., Miesch, L., and Heitz, T. (2017). Jasmonic Acid Oxidase 2 Hydroxylates Jasmonic Acid and Represses Basal Defense and Resistance Responses against Botrytis cinerea Infection. Mol. Plant **10**: 1159–1173.

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. Entomol. Gen.: 163–175.

Sohrabi, F., Nooryazdan, H.R., Gharati, B., and Saeidi, Z. (2017). Plant Resistance to the Moth Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae) in Tomato Cultivars. Neotrop. Entomol. **46**: 203–209.

Solfanelli, C., Poggi, A., Loreti, E., Alpi, A., and Perata, P. (2006). Sucrose-Specific Induction of the Anthocyanin Biosynthetic Pathway in Arabidopsis. Plant Physiol. **140**: 637–646.

Stamp, N. (2004). Can the growth–differentiation balance hypothesis be tested rigorously? Oikos **107**: 439–448.

Stamp, N. (2003). Out of the Quagmire of Plant Defense Hypotheses. Q. Rev. Biol. **78**: 23–55.

Stanjek, V., Miksch, M., and Boland, W. (1997). Stereoselective syntheses of deuterium labelled marmesins; valuable metabolic probes for mechanistic studies in furanocoumarin biosynthesis. Tetrahedron **53**: 17699–17710.

Stanjek, V., Piel, J., and Boland, W. (1999). Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in Apium graveolens (Apiaceae). Phytochemistry **50**: 1141–1146.

Steemans, P., Hérissé, A.L., Melvin, J., Miller, M.A., Paris, F., Verniers, J., and Wellman, C.H. (2009). Origin and Radiation of the Earliest Vascular Land Plants. Science **324**: 353–353.

Stout, M.J., Brovont, R.A., and Duffey, S.S. (1998). Effect of Nitrogen Availability on Expression of Constitutive and Inducible Chemical Defenses in Tomato, Lycopersicon esculentum. J. Chem. Ecol. **24**: 945–963.

Strapasson, P., Pinto-Zevallos, D.M., Paudel, S., Rajotte, E.G., Felton, G.W., and Zarbin, P.H.G. (2014). Enhancing Plant Resistance at the Seed Stage: Low Concentrations of Methyl Jasmonate Reduce the Performance of the Leaf Miner <Emphasis Type="Italic">Tuta

absoluta</Emphasis> but do not Alter the Behavior of its Predator <Emphasis Type="Italic">Chrysoperla externa</Emphasis>. J. Chem. Ecol. **40**: 1090–1098.

Sung, H.-I., Liu, L.-F., and Kao, C.H. (1995). The decrease in polyamine levels is not associated with growth inhibition in suspension-cultured rice cells under nitrogen deficiency. Biol. Plant. **37**: 213.

Takahashi, T., Okiura, A., and Kohno, M. (2017). Phenylpropanoid composition in fig (Ficus carica L.) leaves. J. Nat. Med. **71**: 770–775.

Takahashi, T., Okiura, A., Saito, K., and Kohno, M. (2014). Identification of phenylpropanoids in fig (Ficus carica L.) leaves. J. Agric. Food Chem. **62**: 10076–10083.

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.

Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M., and Smeekens, S. (2005). Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75/PAP1 Gene. Plant Physiol. **139**: 1840–1852.

Tognetti, J.A., Horacio, P., and Martinez-Noel, G. (2013). Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. Plant Signal. Behav. **8**: e23316.

Tuomi, J. (1992). Toward integration of plant defence theories. Trends Ecol. Evol. **7**: 365–367.

Vialart, G., Hehn, A., Olry, A., Ito, K., Krieger, C., Larbat, R., Paris, C., Shimizu, B., Sugimoto, Y., Mizutani, M., and Bourgaud, F. (2012). A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from Ruta graveolens L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. Plant J. **70**: 460–470.

Vidal, E.A. and Gutiérrez, R.A. (2008). A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis. Curr. Opin. Plant Biol. **11**: 521–529.

Vieira, I.J.C., Mathias, L., Monteiro, V.D.F.F., Braz-Filho, R., and Rodrigues-Filho, E. (1999). A New Coumarln from Brosimum Gaudichaudii Trecul. Nat. Prod. Lett. **13**: 47–52.

Vieyra-Garcia, P. et al. (2019). Evaluation of Low-Dose, Low-Frequency Oral Psoralen–UV-A Treatment With or Without Maintenance on Early-Stage Mycosis Fungoides: A Randomized Clinical Trial. JAMA Dermatol. **155**: 538–547.

Villard, C., Larbat, R., Munakata, R., and Hehn, A. (2019). Defence mechanisms of Ficus: pyramiding strategies to cope with pests and pathogens. Planta.

Vogt, T. (2018). Unusual spermine-conjugated hydroxycinnamic acids on pollen: function and evolutionary advantage. J. Exp. Bot. **69**: 5311–5315.

de Vries, J., Evers, J.B., Dicke, M., and Poelman, E.H. (2019). Ecological interactions shape the adaptive value of plant defence: Herbivore attack versus competition for light. Funct. Ecol. **33**: 129–138.

de Vries, J., Evers, J.B., and Poelman, E.H. (2017). Dynamic Plant–Plant–Herbivore Interactions Govern Plant Growth–Defence Integration. Trends Plant Sci. **22**: 329–337.

Wang, F., Ren, G., Li, F., Wang, B., Yang, Y., Ma, X., Niu, Y., Ye, Y., Chen, X., Fan, S., Wang, T., and Zhou, Q. (2018). Overexpression of GmSnRK1, a soybean sucrose non-fermenting-1 related protein kinase 1 gene, results in directional alteration of carbohydrate metabolism in transgenic Arabidopsis. Biotechnol. Biotechnol. Equip. **32**: 835–845.

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. Sci. Rep. **6**: 36543.

Zabolinejad, N., Maleki, M., Salehi, M., Ashrafi, Z., Molkara, S., and Layegh, P. (2019). Psoralen and narrowband UVB combination provides higher efficacy in treating vitiligo compared with narrowband UVB alone: A randomised clinical trial. Australas. J. Dermatol.

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. Mol. Plant. Microbe Interact. **20**: 1439–1448.

Zangerl, A.R., Arntz, A.M., and Berenbaum, M.R. (1997). Physiological price of an induced chemical defense: photosynthesis, respiration, biosynthesis, and growth. Oecologia **109**: 433–441.

Zhang, C.-H., Ma, T., Luo, W.-C., Xu, J.-M., Liu, J.-Q., and Wan, D.-S. (2015). Identification of 4CL Genes in Desert Poplars and Their Changes in Expression in Response to Salt Stress. Genes **6**: 901–917.

Zhu, Q., Dabi, T., Beeche, A., Yamamoto, R., Lawton, M.A., and Lamb, C. (1995). Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. Plant Mol. Biol. **29**: 535–550.

Züst, T. and Anurag A. Agrawal (2017). Trade-Offs Between Plant Growth and Defense Against Insect Herbivory: An Emerging Mechanistic Synthesis. Annu. Rev. Plant Biol. **68**: 513–534.

Züst, T., Joseph, B., Shimizu, K.K., Kliebenstein, D.J., and Turnbull, L.A. (2011). Using knockout mutants to reveal the growth costs of defensive traits. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. **278**: 2598–2603.