

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

*Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

*Spécialité : Biotechnologies végétales*

Présentée et soutenue publiquement par

**Léo-Paul TISSERANT**

Le 10 novembre 2016

---

## DÉVELOPPEMENT DE RACINES TRANSFORMÉES DE VIGNE POUR L'ÉTUDE DES STILBÈNES

---

Thèse dirigée par **Michele BOITEL et Christophe CLEMENT**

### JURY

M. Jean-Louis HILBERT,	, Professeur,	à l'Université de Lille 1 Sciences et Technologies,	, <b>Président</b>
M. Alain HEHN,	, Professeur,	à l'Université de Nancy Lorraine,	, <b>Rapporteur</b>
Mme. Michele BOITEL,	, Professeur,	à l'Université d'Amiens Picardie Jules Verne,	, <b>Examineur</b>
M. Christophe CLEMENT,	, Professeur,	à l'Université de Reims Champagne-Ardenne,	, <b>Examineur</b>
M. Eric COURROT,	, Maître de Conférences,	à l'Université Reims Champagne-Ardenne,	, <b>Examineur</b>
M. Arnaud LANOUE,	, Maître de Conférences,	à l'Université de Tours François Rabelais,	, <b>Examineur</b>







UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE – ARDENNE  
UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE

Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé (547)

**T H E S E**  
Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

Discipline : Sciences de la vie et de la santé,  
spécialisation Biotechnologies végétales

Présentée et soutenue publiquement par  
**Leo-Paul TISSERANT**  
Le 10 / 11 / 2016

Titre :  
**Développement de racines transformées de vigne  
pour l'étude des stilbènes**

**JURY :**

Mme. BOITEL M., Professeur, Université de Picardie Jules Verne  
M. CLÉMENT C., Professeur, Université de Champagne-Ardenne  
M. COUROT E., MCF, Université de Champagne-Ardenne  
M. HILBERT J-L., Professeur, Université de Lille Hauts de France  
M. HEHN A., Professeur, Université de Lorraine  
M. LANOUE A., MCF, Université François Rabelais

Co-directrice  
Co-directeur  
Co-encadrant  
Président du Jury  
Rapporteur  
Examinateur



# Remerciements

---

Ce projet collaboratif a permis de mettre en commun l'expertise de plusieurs laboratoires, dans lesquels j'ai pu travailler et échanger avec beaucoup de personnes. Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans leur aide et leur soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie la **Région Champagne-Ardenne** qui a soutenu ce projet par son financement ainsi que la **SFR Condorcet** qui a approuvé et labellisé ce projet.

Je remercie **Jean-Louis Hilbert** et **Alain Hehn** pour avoir accepté d'être rapporteurs pour ce travail.

Je remercie aussi **Arnaud Lanoue** et **Alain Hehn** pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse, pour m'avoir aiguillé et encouragé lors de nos différentes rencontres, notamment les journées MetaSP.

## A l'URVVC :

---

Merci à **Christophe Clément**, directeur de l'Unité de Recherche Vigne et Vins de Champagne (URVVC - EA 4707) de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses conseils et pour m'avoir toujours poussé à bien remettre chaque résultat dans son contexte pour pouvoir le discuter.

Je remercie tout particulièrement mon co-encadrant de thèse, **Eric Courot**, pour m'avoir fait confiance en me confiant ce projet, avoir partagé sa passion du sujet et sur toute la thématique. Merci aussi pour ses nombreux conseils tout au long du projet ainsi que pour toutes les discussions que nous avons pu avoir.

Merci à **Jérôme Crouzet** pour m'avoir guidé pour toute la recherche de transporteurs de resvératrol, pour le temps qu'il m'a consacré et son dynamisme.

Merci aussi à **Aziz Aziz** pour son aide, ses nombreuses idées et toutes nos discussions. Son entrain est toujours au rendez vous, même lors des périodes très chargées.



Merci à **Philippe Jeandet** pour son implication dans la finalisation de mes publications. Sa passion immodérée pour les publications est un moteur dans cette dernière étape de la recherche !

Je tenais aussi à remercier **Gabriel Guihard**, pour son aide, ses conseils pour les nombreux travaux réalisés ensembles. Merci aussi pour son attitude volontaire et son humour.

Je remercie **Sandra Villaume, Barbara Courteaux, Marie Gacoïn** pour m'avoir aidé à de nombreuses reprises pour toutes les questions matérielles et de fonctionnement du laboratoire.

Merci aussi à **Clarisse Rabenoelina**, pour ses conseils en biologie moléculaire et pour avoir pris le temps de me montrer et me justifier l'ensemble de la démarche.

Un grand merci à **Isabelle Roberrini** pour la gestion sans failles de mes ordres de mission (nombreux et parfois complexes) ainsi que toutes autres démarches, toujours avec une bonne humeur à toute épreuve.

Je souhaitais aussi remercier tous les collègues et amis avec qui j'ai partagé le bureau : **Medhi, Alessandro, Claire, Hélène, Damien, Fan, Cindy, Aurélie, Enrico** et bien d'autres : **Romain, Patricio, Lidiane, Catia, Morgane, Marine, Julie, Carine** pour la bonne ambiance et l'entraide collective. Nous avons passé de très bons moments et supporté les moins bons ensembles. Merci à **Jeff** pour son humour décapant et pour animer les BHs, moments de rencontres et de convivialité.

## **Au BIOPI :**

---

Je remercie **Eric Gontier**, directeur de l'Unité Biologie des Plantes et contrôle des Insectes ravageurs (BIOPI - EA-3900) pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour la pertinence de ses questions lors de nos échanges et de mes présentations à Amiens.

Un grand merci à **Michèle Boitel**, co-encadrante de thèse et responsable de l'Axe Recherche Technologie du BIOPI, pour son soutien et l'attention dont elle a fait preuve tout au long de ce projet. Elle a su assurer de l'avancement du projet de façon très systématique tout en considérant les difficultés techniques imposées.





Mes remerciements aussi à **Michelle Lequart** pour son aide précieuse sur l'analyse des extraits de nos racines et pour avoir pris le temps de me former à l'exploitation des données de LC-MS et MSMS.

Je remercie **Nathalie Jullian** pour ses conseils pour la génération des racines transformées, ainsi que son aide lors de la rédaction des articles.

Merci à **François Guérineau** pour ses conseils, son scepticisme (et l'humour associé) qui ont été très constructifs lors de nos discussions.

Je tiens à remercier **Solène Bassard** pour avoir pris soin de mes lignées de racines lorsque je n'étais pas à Amiens, pour sa sympathie et son sourire en toutes circonstances. Merci aussi à **Olivier Habrylo**, qui m'a aidé à de nombreuses reprises.

Je remercie aussi les doctorants et post-doctorants du labo que j'ai pu côtoyer et avec qui j'ai travaillé, discuté, ri et râlé un peu, notamment **Nga** et **Benjamin** avec qui j'ai partagé le bureau ; mais aussi **Ludivine**, **Fabien S.**, **Fabien M.**, **Florian**, **Cédric**, **Sylvain**, **Romain** et tous les autres que je n'ai croisé que plus occasionnellement (axes et/ou bâtiments différents). Parmi eux, les membres du BIOPI Junior, qui ont mis en place la rédaction d'une newsletter avec les nouvelles, la vie du laboratoire, des animations, les séminaires, etc. Au top !

Du LG2A, je remercie **Eric Grand**, qui m'a accueilli dans le laboratoire de chimie et m'a guidé pour les essais de synthèse chimique de coumarate. Je remercie aussi **Gilbert** pour son aide et ses conseils dans ce laboratoire. Merci pour votre patience alors que je n'y connaissais rien. Un mot de remerciement aussi pour **David Lesur**, qui m'a formé au fonctionnement de la MS et avec qui nous avons pu réaliser les premières analyses de LC-MS ayant servi de base pour les analyses suivantes.

De la Plateforme Analytique d'Amiens, je remercie **Serge Pilard** qui a pu me consacrer un peu de temps pour m'expliquer mes résultats de MSMS malgré son emploi du temps chargé et pour les analyses qu'il a réalisées quand il avait un moment de libre.

A l'ICMR : Merci beaucoup à **Jane Hubert** pour toute l'aide qu'elle m'a apporté et son efficacité depuis l'acquisition des données de CPC-RMN, l'exploitation et jusqu'à pour la



rédaction du papier. Je remercie aussi **Nicolas Borie** et **Nicolas Maurin** pour leur participation à ce travail.

Je souhaite aussi remercier **Christine Terryn**, du PICT, pour sa maîtrise des méthodes d'imagerie, pour ses discussions et son humour très particulier qui ont joint l'utile à l'agréable lors des longues acquisitions en microscopie confocale.

Je remercie **Antoine Champagne**, de l'Université de Louvain la Neuve, pour avoir réalisé les analyses et nous avoir aidés à l'exploitation des données d'iTRAQ.

De l'école doctorale, je souhaitais remercier **Nathalie Le Barch**, **Estelle Odinot** et **Perrine Rafflin**, qui ont toujours été très réactives pour toutes mes démarches et mes questions. Je les remercie aussi, ainsi que **toute l'équipe MT180** et les autres participants, pour les très bons moments passés de la préparation de la présentation jusqu'à la représentation.

Merci aussi à **Isaure** et **Guillaume** pour leur gentillesse et pour m'avoir accueilli chez eux le temps de quelques séjours à Amiens.

Je souhaitais aussi remercier **mes amis**, que je n'ai pas pu voir autant que je le souhaitais mais qui m'ont aidé à oublier un peu le travail le temps d'un weekend ou d'une sortie. Je remercie particulièrement **Fred**, **Thomas** et **Stéphanie** pour les bons moments passés en Alsace, **Stéphane**, **Lionel**, **Alessandro** et **Bruno** pour mes séjours à Luxembourg, **Robin** et toute l'équipe MH pour les weekends en Belgique.

Merci à **Agnès**, **Jean-Luc** et **Pierre-Yves** pour leur soutien, leur aide, ainsi que pour tous les agréables moments passés à St-Avold, en vacances ou en weekend.

Finalement je remercie toute **ma famille** et en particulier **mes parents**, qui ont toujours tout fait pour moi. Ils m'ont soutenu quels que soient mes choix et m'ont toujours donné les moyens de les réaliser. Ils m'ont appris la curiosité et la rigueur, qui m'ont progressivement mené vers ce que je suis. Je remercie aussi les frères et ma sœur : **Bi**, **Jim** et **Ann-Eva**, ainsi que **Glynis** et **Andrew** pour leur soutien et les moments exceptionnels que l'on passe ensemble.

Je garde le mot de la fin pour **Anne-Sophie**, qui a partagé mon quotidien qui m'a soutenu et supporté tout au long de ma thèse. Merci pour tes conseils et merci d'être là, tout simplement.



# Sommaire

---

Liste des abréviations .....	13
Production scientifique relative au travail de thèse.....	15
Résumé .....	17
Liste des figures .....	20
Liste des tableaux .....	20
Introduction .....	21
Etude bibliographique .....	25
1 La vigne .....	25
2 Les métabolites spécialisés et phénylpropanoïdes.....	25
3 Les mécanismes de défense des plantes et de la vigne .....	27
3.1 Les défenses passives .....	29
3.2 Les défenses actives .....	31
4 Les stilbènes principaux chez la vigne et leur biosynthèse .....	35
5 Régulation de la biosynthèse des stilbènes .....	41
6 La production de stilbènes .....	47
6.1 Approche par extraction directe .....	47
6.2 Approche par synthèse chimique .....	29
6.3 Approche par biotechnologies microbiennes .....	51
6.4 Approche par biotechnologies végétales .....	53
6.5 Production de stilbènes pour la défense des plantes.....	55
7 Les racines transformées.....	57
7.1 Origine et mécanisme .....	57
7.2 Caractéristiques des racines transformées .....	59
7.3 Les principaux axes de recherche sur les racines transformées .....	61
7.4 Les racines transformées de vigne.....	67
8 Localisation des différents stilbènes .....	69
8.1 Au niveau de la plante .....	71
8.2 Au niveau tissulaire et cellulaire .....	73
9 Transport de métabolites secondaires et stilbènes dans la plante .....	75
Objectifs de la thèse .....	81
Travaux, résultats et discussion.....	85
1 <sup>er</sup> Article : Établissement des "Hairy roots" et caractérisation .....	87
2 <sup>ème</sup> Article : Profilage phytochimique des HRs .....	111
3 <sup>ème</sup> Article : Le transport du <i>t</i> -resvératrol .....	139
Conclusion générale et perspectives .....	183
Références .....	195
ANNEXES .....	279
4 <sup>ème</sup> Article : les cultures de cellules de vigne en suspension pour la production de stilbènes.....	281
5 <sup>ème</sup> Article : nouveau procédé d'extraction du <i>t</i> -resvératrol .....	293



# Liste des abréviations

---

2,4-D : Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique  
4CL : 4-Coumarate : CoA Ligase  
ABA : ABscissic Acid  
ABC : ATP Binding Cassette  
AcOEt : Acétate d'Éthyle  
ADNc : Acide Désoxyribose Nucléique complémentaire  
ARNm : Acide Ribose Nucléique messenger  
ATCC : nomenclature "American Type Culture Collection"  
ATP : Adénosine Tri-Phosphate  
B5 : Gamborg  
BAP : 6-BenzylAminoPurine (ou Benzyl adénine)  
C4H : Cinnamate 4-Hydrogénase  
CD : CycloDextrines  
CHS : CHalcone Synthase  
CoA : Coenzyme A  
CPC : Chromatographie de Partage Centrifuge  
CPK : Créatine Phosphokinase  
CPR : Cytochrome P450 Réductase  
EC : Classification d'Enzyme  
ET : Éthylène  
FDA : Fluorescein Diacetate  
g MF : Grammes de Matière Fraîche  
g MS : Grammes de Matière Sèche  
GST : Glutathion S-Transferases  
HSR : Réponse HyperSensible  
JA : Acide JAsonique  
Kin : Kinétine  
LC-MS : Spectrométrie de Masse couplée à une Chromatographie Liquide  
MAMP : Microbe Associated Molecular Pattern  
MATE : Multidrug And Toxic compound Extrusion  
MeJA : Méthyl JAsonate  
MeOH : Méthanol  
MIMP : Microbe Induced Molecular Pattern  
MM : Martin et Morel  
MS : Milieu Murashige et Skoog  
MSMS : Spectrométrie de Masse en tandem  
NAA : Acide 1-NaphthaleneAcétique  
NRT : Nitrate-peptide Transporteur  
OGM : Organisme Génétiquement Modifié  
PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase  
PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria  
PR : Pathogen-Related  
PRR : Pathogen Recognition Receptors  
PUP: purine perméase  
qPCR : Réaction de Polymérase en Chaîne quantitative  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
ROMT : Resvératrol O-Méthyl Transférase  
RT-PCR : Reverse Transcription suivie d'une Réaction de Polymérase en Chaîne  
SA : Acide Salicylique  
SAM : S-AdenosylMéthionine  
SH : Shenk et Hildebrandt  
STS : Stilbène Synthase  
TAL : Tyrosine Ammonia Lyase  
UPLC : Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance  
UV : UltraViolets  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
YMB : Yeast Mannitol Broth





# Production scientifique relative au travail de thèse

---

## Publications :

- Jeandet P, Clément C, **Tisserant LP**, Crouzet J et Courot E. *Use of grapevine cell cultures for the production of phytostilbenes of cosmetic interest*. Comptes Rendus de Chimie de l'Académie des Sciences, publié.
- **Tisserant LP**, Aziz A, Jullian N, Jeandet P, Clément C, Courot E et Boitel-Conti M. *Enhanced stilbene production and excretion in Vitis vinifera cv Pinot noir hairy root cultures*. Molecules, publié.
- **Tisserant LP**, Hubert J, Lequart M, Nicolas N, Maurin N, Pilard S, Jeandet P, Aziz A, Clément C, Boitel M et Courot E. <sup>13</sup>C NMR and LC-MS Profiling of Stilbenes from Elicited Grapevine Hairy Root Cultures. Journal of Natural Products, publié.
- Al balkhi MH, Mohammad MA, **Tisserant LP** et Boitel-Conti M. Optimization of liquid-liquid extraction of resveratrol from cell culture media using solubility parameters. Separation and Purification Technology, publié.

## Communications orales :

- **Tisserant LP**, Aziz A, Jullian N, Lequart M, Jeandet P, Clément C, Courot E et Boitel-Conti M. *Cinétique de production des dérivés de resvératrol dans des racines transformées de vigne*. 2<sup>èmes</sup> Journées MétaSP (2014, Lille, France).
- **Tisserant LP**, Challenge de Vulgarisation Scientifique MT180, 2014 (Reims, France). *De la vigne au médicament*.
- **Tisserant LP**, Challenge de Vulgarisation Scientifique MT180, 2015 (Reims, France). *Solution aux problèmes cardiovasculaires : dialogue avec des racines de vigne*.
- **Tisserant LP**, Lequart M, Hubert J, Pilard S, Aziz A, Clément C, Boitel M et Courot E. *Bioproduction de molécules végétales d'intérêt : utilisation de racines transformées de vigne pour l'étude des stilbènes en conditions axéniques*. Journées Jeunes Chercheurs Condorcet 2016 (Reims, France).

## Posters :

- **Tisserant LP**, Courot E, Clément C et Boitel-Conti M. *Developpement of grapevine hairy roots for the study and bioproduction of stilbenes*. 1<sup>ères</sup> Journées MetaSP (2014, Amiens, France).
- **Tisserant LP**, Aziz A, Courot E, Clément C et Boitel-Conti M. *Grapevine hairy roots as a tool for the study and the bioproduction of stilbenes*. 3<sup>èmes</sup> Journées MetaSP (2015, Tours, France).



# Résumé

---

## Développement de racines transformées de vigne pour l'étude des stilbènes

Ce travail porte sur la mise au point et l'étude d'un nouveau système de culture *in vitro* permettant une production efficace de dérivés de *t*-resvératrol. Pour cela, des lignées de racines transformées de *Vitis vinifera* L. ont été établies, stabilisées et criblées. Le faible taux de croissance a été amélioré par criblage de différents milieux de cultures et différentes concentrations en saccharose, montrant une préférence pour le milieu ½ SH avec 2% (p/v) de saccharose. Les cinétiques de croissance et de production de stilbènes ont ensuite été évaluées dans ces conditions. Nous avons mis en évidence une production basale de stilbènes par les racines, bien que celles-ci soient aussi fortement inductibles par des traitements d'élicitation par du méthyl jasmonate et des cyclodextrines. Dans ces conditions, les racines transformées de vigne ont montré une forte capacité de production et d'excrétion de différents stilbènes. Un profilage phytochimique des racines et de leur milieu de culture a été réalisé par CPC-RMN et LC-MS pour illustrer cette diversité. En parallèle des études sur un modèle simplifié, les cultures de cellules en suspension ont été réalisées pour rechercher des transporteurs candidats pour l'excrétion active du *t*-resvératrol vers son lieu d'action. Une approche de protéomique globale de la membrane plasmique par iTRAQ a permis de cibler des candidats de type ABC transporteurs, qui ont ensuite été caractérisés par des approches d'étude de l'expression de leurs transcrits. Ensemble, ces résultats soutiennent l'intérêt de cet outil pour l'étude du métabolisme ainsi que pour la bioproduction de stilbènes.

**Mots clés :** *Vitis vinifera* L., racines transformées, stilbènes, *t*-resvératrol, viniférines, méthyl jasmonate, cyclodextrines, profilage phytochimique, transporteurs

---

## Setting up grapevine hairy root cultures for the study of stilbenes

This work aims at the setting up and the study of a new *in vitro* culture for a cost-effective production of highly pure resveratrol derivatives. To answer that need, hairy root lines of *Vitis vinifera* L. were established, stabilized and screened. Their low growth rate was improved by testing various culture media and different sucrose concentrations. The best growth rate was obtained with ½ SH medium with 2% (w/v) sucrose. The growth and stilbene production kinetics were assessed in these conditions. A constitutive production of stilbenes was observed in roots, though they showed a strong response to eliciting treatments such as methyl jasmonate and cyclodextrines. In these conditions, the hairy roots yielded high stilbene production in terms of concentrations as well as diversity. The diversity of the stilbenes obtained has been described by biochemical profiling of both root and their culture medium extracts using CPC-NMR and LC-MS. Together with the study of hairy roots, we used cell suspensions cultures as a simplified model to study the excretion of *t*-resveratrol. Candidate transporters have been screened for using a global plasma membrane proteomic approach based of iTRAQ. ABC G transporters were pointed out as promising candidates and were further characterized by studying their gene expression. Together, these results support the interest of grapevine hairy root cultures for the study of stilbenes metabolism and their bioproduction.

**Key words:** *Vitis vinifera* L., hairy roots, stilbenes, *t*-resveratrol, viniferins, methyl jasmonate, cyclodextrins, chemical profiling, transporters

---

**Discipline :** Sciences de la vie et de la santé, spécialisation Biotechnologies végétales

Laboratoire de Biologie des Plantes & Innovation EA 3900, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Picardie Jules Verne, UFR des Sciences, Ilot des Poulies, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne EA 4707, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.



## Liste des Figures

---

Figure 1 : schéma général du lien entre le métabolisme primaire et le métabolisme spécialisé des plantes détaillant les composés phénoliques.....	24
Figure 2 : structure des principales anthocyanes de la vigne .....	26
Figure 3 : représentation simplifiée des mécanismes de défenses des plantes.....	28
Figure 4 : état des connaissances sur la voie de biosynthèse des stilbènes chez la vigne à partir de la voie de phénylpropanoïdes : biosynthèse et régulation. ....	36
Figure 5 : structure chimique de quelques dérivés de resvératrol .....	38
Figure 6 : nombre de publications scientifiques sur le resvératrol au cours du temps.....	40
Figure 7 : synthèse chimique du resvératrol.....	48
Figure 8 : évolution d'une suspension de cellules après élicitation .....	54
Figure 9 : structure d'une cyclodextrine et formation du complexe cyclodextrine- <i>t</i> -resvératrol. ....	54
Figure 10 : représentation schématique du plasmide Ri de <i>R. rhizogenes</i> .....	58
Figure 11 : représentation schématique du transfert de la région T du plasmide Ri de <i>R. rhizogenes</i> lors de la transformation d'une cellule de plante .....	58
Figure 12 : interactions plante – agrobacterie .....	60
Figure 13 : domaines de recherche utilisant des racines transformées .....	62
Figure 14 : distribution du <i>t</i> -resvératrol, de la STS et de ses transcrits dans les différents organes de la vigne.....	72
Figure 15 : principaux types de transports transmembranaires.....	74

## Liste des Tableaux

---

Tableau 1 : effet de différents éliciteurs sur la production de <i>t</i> -resvératrol par des cellules de 41B ( <i>Vitis vinifera</i> x <i>Vitis berlandieri</i> ) en suspension. ....	42
Tableau 2 : utilisation de microorganismes pour la production de <i>t</i> -resvératrol.....	50
Tableau 3 : tableau récapitulatif des systèmes de végétaux autres que cellules en suspension pour la production de stilbènes.....	52
Tableau 4 : gènes de stilbène synthèses et promoteurs utilisés pour transformer des plantes, leur effets et activités.....	56
Tableau 5 : transporteurs impliqués dans le déplacement de métabolites spécialisés chez les plantes.....	76



# Introduction

---

Au cours de son histoire, la région Champagne-Ardenne a développé sa renommée et son savoir-faire sur la culture de la vigne, notamment pour la production de vin et de Champagne. Son vignoble représente un atout important pour l'économie, avec un chiffre d'affaires 2015 s'élevant à 4,7 milliards d'euros pour le Champagne (source : Le Comité Champagne, 2016). La santé et la qualité des vignobles représentent donc un enjeu économique considérable. Actuellement, l'utilisation de pesticides pour la viticulture représente 20 % des traitements utilisés en France pour seulement 3 % de la surface agricole totale. Ces produits sont de plus en plus controversés du fait de leur impact sur la santé et sur l'environnement. Dans ce contexte, l'Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne (URVVC, EA 4707) de l'URCA travaille actuellement sur des alternatives aux traitements chimiques par la stimulation des défenses naturelles de la vigne en se basant sur la compréhension des mécanismes biochimiques mis en œuvre par cette plante pour lutter contre ses prédateurs. Chez la vigne, ce sont les stilbènes qui représentent les molécules de défense majoritaires. Ils sont particulièrement bioactifs contre les attaques fongiques, virales et bactériennes. Cependant, la stimulation, la régulation et le transport des stilbènes restent actuellement encore trop mal connus pour être exploités dans les vignobles. Ceci constitue donc des axes de recherche importants. Afin de répondre à ces questions, l'URVVC a développé son expertise sur la culture de cellules de vigne en suspension (41B et *Vitis labrusca*), la production de stilbènes par des traitements d'élicitation et leur analyse.

Outre leur intérêt agronomique, les stilbènes font l'objet de beaucoup d'attention du fait de leurs nombreuses activités d'intérêt nutraceutique, cosmétique et pharmaceutique. Malheureusement, les méthodes de production actuelles (par extraction à partir de biomasse végétale, par des microorganismes ou par synthèse chimique) ne permettent pas d'accéder à de nombreux dérivés stilbéniques actifs en quantités suffisantes tout en respectant les exigences de coût et de qualité des industries pharmaceutiques. Les moyens de production par extraction à partir de biomasse végétale, présentant habituellement des concentrations en molécules actives <10 % de la masse sèche (m/m), génèrent un coût global de production élevé et ont un impact environnemental non négligeable.

Les biotechnologies développent des procédés de culture *in vitro* tels que les cultures de cellules de vigne en suspension, permettant une production et une excrétion importante de resvératrol (7 g/l) et de certains de ces dérivés en quantités moindres. Ils présentent





néanmoins des inconvénients pour leur transfert à l'échelle industrielle : un manque de stabilité génétique observé chez certaines cultures ainsi que des contraintes techniques liées à une culture continue en volumes importants. Finalement seul le *trans*-resvératrol est aujourd'hui largement exploité, souvent sous forme non purifiée (par exemple en cosmétique et nutraceutique). Ses dérivés, et notamment ses dimères, trimères et tetramères, restent encore peu accessibles malgré une activité parfois plus prononcée. Pour tenter de répondre aux attentes industrielles, le laboratoire de Biologie des Plantes & Innovation (BIOPI, EA 3300) de l'UPJV travaille sur la mise au point et l'étude de solutions innovantes pour la bioproduction de molécules d'intérêt, notamment en utilisant des cultures de racines transformées en bioréacteurs. Cette expertise s'ajoute à celle de l'URVVC sur la production de fagaronine, un alcaloïde, par des racines transformées de *Fagara zanthoxyloides* L.

Les deux laboratoires sont de plus impliqués dans des réseaux destinés à fédérer les laboratoires de recherche dans le but de favoriser la collaboration, la mise en commun de leurs compétences et les échanges interdisciplinaires. C'est notamment le cas de la SFR Condorcet, spécialisée dans la valorisation des agro-ressources, de l'environnement et du développement durable ; et du réseau MetaSP, se concentrant sur les différents aspects du métabolisme spécialisé ("secondaire") des plantes. Tous deux réunissent des experts, de laboratoires publics comme privés, de domaines aussi variés que la chimie, la physique, l'agronomie et les biotechnologies.

Dans ce contexte, il est tout à fait pertinent de chercher une alternative aux procédés de production et d'extraction actuels de ces molécules en mettant en commun le savoir faire des différents partenaires. Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet STiLROOT, qui propose de développer un procédé de production de nouveaux stilbènes utilisant des racines transformées (dites "hairy roots") de vigne. Ces racines, obtenues par infection de la plante avec *Rhizobium rhizogenes* sont connues pour leur grande stabilité génétique du fait de leur niveau de différenciation, en opposition aux cellules dédifférenciées. Elles sont de plus compatibles avec des procédés de bioproduction en continu et sont cultivables en volumes importants (jusqu'à 10 000 l). En se basant sur l'expertise des différents laboratoires impliqués, ce projet permettra de fournir et de caractériser un nouvel outil pour l'étude et la bioproduction de stilbènes. Dans le futur, il permettra de plus l'étude du système racinaire de la vigne, encore mal connu, de son métabolisme et des interactions avec son environnement.

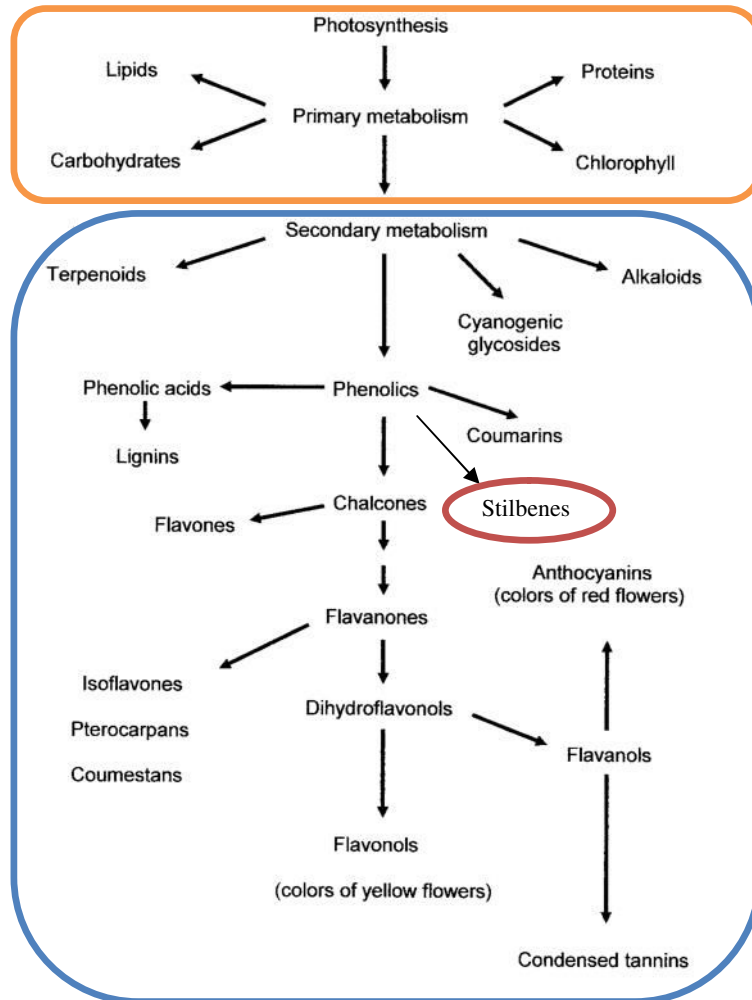


Figure 1 : relations entre le métabolisme primaire (orange) et le métabolisme spécialisé (bleu) des plantes détaillant les composés phénoliques (Reis Giada, 2013).

# Etude bibliographique

---

## 1 La vigne

La vigne est une plante domestiquée depuis plus de 5 siècles pour ses fruits et produits dérivés. Cultivée à grande échelle, elle a pris une grande importance économique dans les régions viticoles notamment en France dans la région Champagne-Ardenne, la Bourgogne, l'Alsace, la vallée de la Loire, la vallée du Rhône et la région de Bordeaux entre autres.

Les bienfaits d'une consommation modérée en vin sont décrits depuis longtemps. A la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, le terme de "Paradoxe Français" apparaît même pour décrire la réduction des risques cardiovasculaires liée aux habitudes alimentaires françaises (Renaud et de Lorgeril, 1992). Cette protection cardiovasculaire a ensuite été associée à la consommation de vin rouge, particulièrement riche en polyphénols provenant majoritairement de la peau du raisin (Fornara *et al.*, 2008).

Parmi ces molécules du métabolisme spécialisé "secondaire" des plantes, beaucoup ont été décrites comme ayant des effets bénéfiques sur la santé. Ces propriétés, basées sur leur caractère antioxydant (Castellano *et al.*, 2014), antibactérien (Hwang et Lim, 2015), ou encore anticancéreux (Roleira *et al.*, 2015), en font des molécules particulièrement attractives pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques.

## 2 Les métabolites spécialisés et phénylpropanoïdes

Le métabolisme spécialisé, en opposition au métabolisme primaire, regroupe toutes les molécules qui ne sont pas impliquées dans l'assimilation des nutriments, la croissance et le développement dans un organisme (figure 1). Chez les plantes, ce métabolisme regroupe (i) les molécules signal permettant les interactions plante-plante ou plante-microorganisme, (ii) les molécules de défense et (iii) les molécules d'attraction des pollinisateurs. Parmi ces molécules du métabolisme spécialisé on retrouve les phénylpropanoïdes. La famille des phénylpropanoïdes est composée des molécules issues de la phénylalanine. La première enzyme de cette voie de biosynthèse est la phénylalanine ammonia lyase (PAL, EC 4.1.3.5) (Koukol et Conn, 1961) menant à la formation du cinnamate, lui-même transformé en coumarate puis en coumaroyl CoA grâce à la cinnamate 4-hydroxylase (C4H, EC 1.14.13.11,

pelargonidin-3- <i>O</i> -glucoside	$R_1=H; R_2=H$
cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	$R_1=H; R_2=OH$
peonidin-3- <i>O</i> -glucoside	$R_1=OCH_3; R_2=H$
delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	$R_1=OH; R_2=OH$
petunidin-3- <i>O</i> -glucoside	$R_1=OCH_3; R_2=OH$
malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	$R_1=OCH_3; R_2=OCH_3$
$R_3=H$ , glucose	
$R_4=H$ , acetyl, <i>p</i> -hydroxycinnamoyl, caffeoyl	

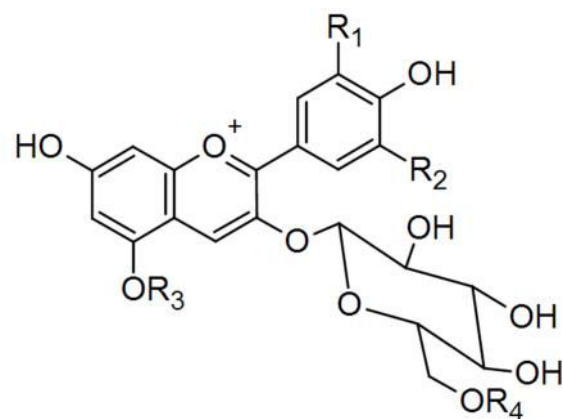


Figure 2 : structure des principales anthocyanes de la vigne (Flamini *et al.*, 2013)

(Russell et Conn, 1967) et 4-coumarate CoA lyase (4CL, EC 6.2.1.12) (Lindl *et al.*, 1973) respectivement.

Cette voie métabolique représente la porte d'entrée des voies de biosynthèse des grands groupes de molécules dérivant des phénylpropanoïdes : les lignines, lignanes, flavonols, benzoates, salicylates, coumarines, chalcones, flavones, anthocyanes, isoflavonoïdes et stilbènes. Ces molécules sont impliquées dans de nombreux mécanismes (Dixon et Paiva, 1995) de défense contre les stress biotiques et abiotiques ou peuvent avoir un rôle structural dans la plante.

La vigne est une plante particulièrement riche en polyphénols tels que les anthocyanes, les flavonols et les stilbènes (Flamini *et al.*, 2013 ; Ali *et al.*, 2010). Les flavonoïdes, qui incluent les anthocyanes et les flavonols, sont synthétisés à partir de coumaroyl-CoA + 3 Malonyl-CoA avec une CHalcone Synthase (CHS) (Kreuzaler et Hahlbrock, 1972) tandis que les stilbènes sont synthétisés par une STilbène Synthase (STS) (Rolfs et Kindl, 1984) à partir des mêmes substrats. Les anthocyanes (figure 2) sont responsables de la coloration de la peau du raisin rouge et du vin rouge et sont notamment impliqués dans la protection de la plante contre les UVs, les stress oxydants et la défense lors d'attaques de pathogènes (Chalker-Scott, 1999). Les flavonols sont aussi responsables de la pigmentation et de la photoprotection chez la vigne. Les plus communs chez la vigne sont le kaempférol, la quercétine, la myricétine, l'isorhamnétine et la laricitrinsyringétine, en proportions très variables selon le cépage (Flamini *et al.*, 2013). Les stilbènes sont des molécules importantes impliquées dans la défense de la vigne. Leurs caractéristiques sont traitées plus en détail par la suite.

### 3 Les mécanismes de défense des plantes et de la vigne

Au cours de son évolution, la vigne a développé des mécanismes de défense passifs et actifs contre les pathogènes et agresseurs. La co-évolution avec certains pathogènes a donné lieu à l'apparition de nouveaux caractères compétitifs chez les différentes espèces (Rausher, 2001, Futuyma et Agrawal, 2009). Ces adaptations sont composées de changements tant physiologiques que métaboliques (figure 3). Pour la plante, ces mécanismes visent à augmenter ses chances de survie (i) en éliminant le pathogène, (ii) en freinant sa progression ou (iii) en décourageant les herbivores et ravageurs.

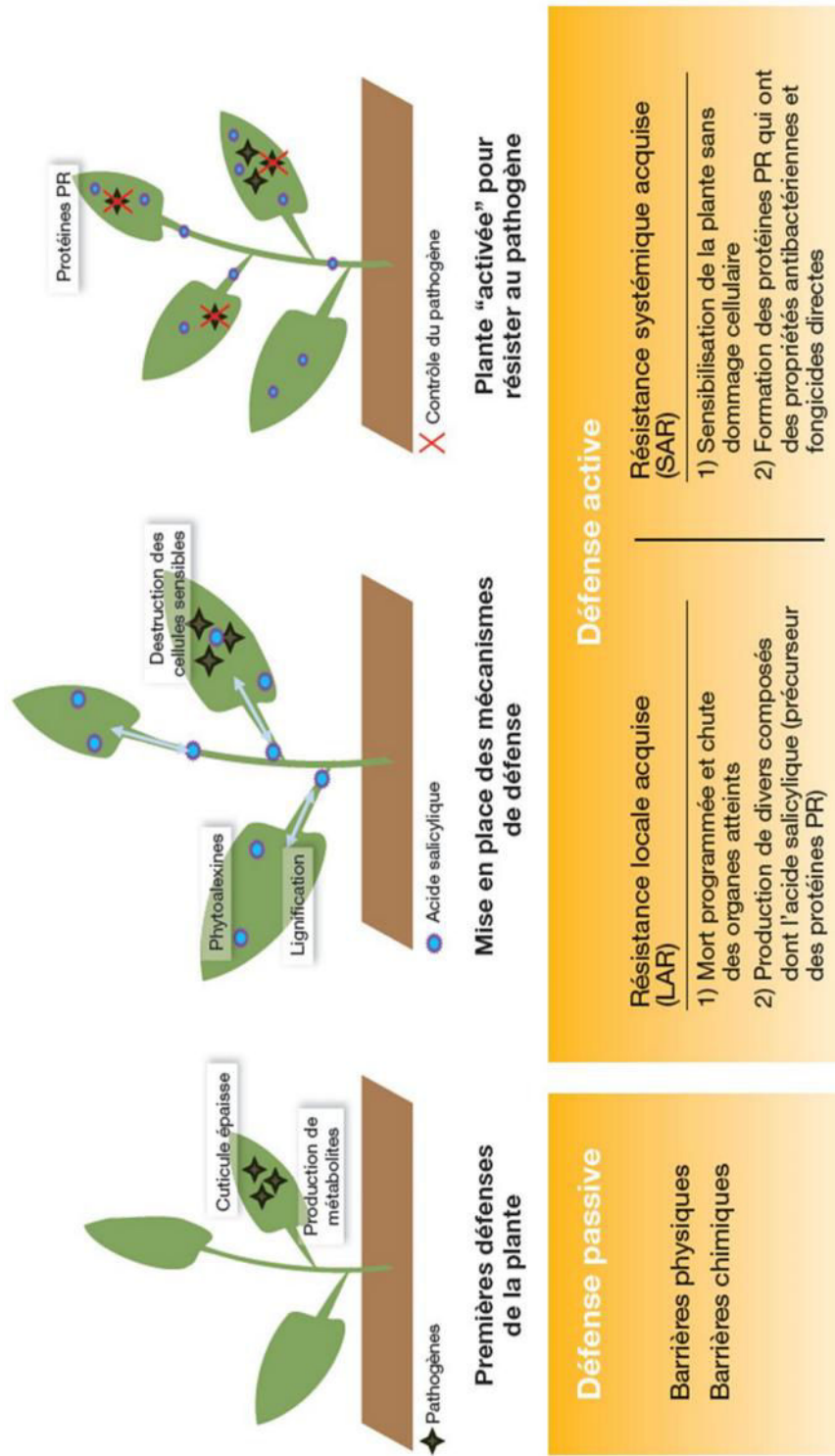


Figure 3 : représentation simplifiée des mécanismes de défenses des plantes (source : Syngenta.com, août 2016)

### 3.1 Les défenses passives

#### Les défenses physiques

Le premier moyen de défense de la plante contre les pathogènes consiste à limiter ou freiner son entrée dans les tissus. La cuticule constitue une première barrière, au dessus de l'épiderme, qui permet par exemple de ralentir l'infection d'*Arabidopsis thaliana* par *Botrytis cinerea* (Bessire *et al.*, 2007).

Les trichomes contribuent aussi à la protection des parties supérieures de la plante. Il en existe deux types, (i) les trichomes simples, dont un des rôles est de limiter la surface de contact entre la feuille et le pathogène et donc d'empêcher la croissance du tube germinatif des champignons (Stenglein *et al.*, 2005) et (ii) les trichomes glandulaires, qui sont capables d'accumuler des métabolites spécialisés impliqués dans la défense (Wagner, 1991) et de les libérer au contact d'un herbivore ou d'un ravageur par exemple.

Les cellules végétales sont entourées d'une paroi, un réseau composé principalement de cellulose, hémicelluloses et de pectines. Cette barrière ralentit la progression des pathogènes (Showalter, 1993), qui doivent être capables de la percer ou posséder des enzymes capables de la dégrader pour entrer dans les tissus.

#### Les défenses chimiques

Un autre type de défense passive des plantes est la production constitutive de molécules chimiques dirigées contre leurs agresseurs. Ces molécules, appelées phytoanticipines (van Etten *et al.*, 1994), peuvent présenter des caractéristiques variées telles qu'une odeur ou un goût désagréable pour l'agresseur, une toxicité, l'inhibition d'enzymes du pathogène, ou d'autres effets tels que la déstabilisation de membranes.

La plante possède des moyens de se protéger des éventuels effets toxiques de ces composés, notamment en les stockant dans des structures spécialisées, telles que les trichomes glandulaires, ou dans les vacuoles sous forme glycosylés. Ces formes de stockage, souvent plus stables et moins actives (Jones et Vogt, 2001), peuvent par exemple être activées par des glycosidases situées dans le cytoplasme lors de la lésion des tissus (Wittstock et Gershenzon, 2002).

Chez la vigne, on retrouve des stilbènes et des picéides de manière constitutive dans certains organes (Wang *et al.*, 2010) tels que les racines et le bois. Ce point sera décrit plus en détail dans le chapitre localisation.





## 3.2 Les défenses actives

Les mécanismes de défense actifs sont les réactions mises en place par la plante suite à la reconnaissance d'un pathogène ou d'un stress. Ils sont plus exigeants en ressources pour la plante et se font habituellement au détriment du métabolisme primaire (Rojas *et al.*, 2014). Afin que la réponse soit efficace, la plante doit être capable (i) de reconnaître le pathogène, (ii) de mettre en place une cascade de signalisation au niveau cellulaire et éventuellement au niveau de la plante entière et (iii) de mettre en place une défense rapide et adaptée au pathogène. En plus de l'ampleur de la réaction de défense, sa localisation (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011 ; Bellow *et al.*, 2012) et sa rapidité (Pool *et al.*, 1981) ont été montrées comme des paramètres très importants dans la résistance contre un agent pathogène.

### **La reconnaissance du pathogène et signalisation**

La reconnaissance non spécifique d'un pathogène passe par la reconnaissance d'un MAMP (Microbe-Associated Molecular Pattern), que l'on retrouve chez un grand nombre de pathogènes ou d'un MIMP (Microbe-Induced Molecular Pattern), qui proviennent du soi modifié. Les MAMP sont habituellement des protéines telles que la flagelline, présente dans les flagelles de bactéries (Zipfel *et al.*, 2004), ou des polysaccharides tels que ceux constituant la paroi des champignons (Shibuya et Minami, 2001). Les MIMP sont des modifications du soi induites par un organisme extérieur, par exemple des produits de dégradation de la paroi ou de protéines (Mackey et McFall, 2006). Les motifs sont reconnus par les récepteurs PRR (Pathogen Recognition Receptors) situés au niveau de la membrane plasmique (Kauffmann *et al.*, 2009), qui vont induire la cascade de signalisation pour la mise en place des défenses (Thordal-Christensen, 2003).

La signalisation pour la mobilisation des mécanismes de défense consiste en une série d'événements, tels que des influx de  $Ca^{2+}$ , d'espèces réactives de l'oxygène et de phosphorylations/déphosphorylations, modulés dans le temps et dans leur intensité en fonction de l'inducteur (Garcia-Brugger *et al.*, 2006). Cette cascade d'événements peut conduire notamment à la synthèse d'acide jasmonique (JA), d'acide salicylique (SA) et d'éthylène (ET), des phytohormones impliquées dans la réponse. La voie du SA est habituellement mobilisée dans le cas des agents pathogènes biotrophes, tandis que celle du JA et de l'ET sont habituellement impliquées dans la réponse aux pathogènes nécrotrophes, aux attaques par des herbivores et lors des blessures (Pieterse *et al.*, 2009). La voie du SA se caractérise par la mise en place de la réponse systémique acquise (SAR), propageant



l'information de signalisation du pathogène dans toute la plante pour améliorer sa réponse en cas d'une nouvelle attaque (Pieterse *et al.*, 2009). Un autre mécanisme de défense systémique, le SIR (Systemic Induced Resistance) peut être mis en place suite à la reconnaissance de microorganismes bénéfiques de type PGPR par exemple (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) et ainsi améliorer la réponse de défense contre un pathogène (Pieterse *et al.*, 2014).

De plus, lorsque les plantes reconnaissent un agent pathogène ou sont soumises à un stress, elles sont capables d'induire une potentialisation de leurs défenses (Conrath *et al.*, 2015). Ce phénomène permet une réponse plus rapide et plus importante à des attaques de pathogènes ou à un stress ultérieur.

Dans le cas où un pathogène est capable de contourner les défenses non spécifiques de la plante avec un nouvel effecteur, leur co-évolution va mener à la mise en place d'interactions spécifiques, dites gène-pour-gène (Flor, 1942). L'évolution de la plante va conduire à la mise en place de défenses spécifiquement dirigées contre son pathogène. Ce dernier pourra alors à son tour développer un nouvel effecteur pour contourner cette immunité spécifique et ainsi de suite (Jones et Dangle, 2006).

### **Les réactions de défense**

Parmi les défenses actives mises en œuvre, les plantes peuvent renforcer leurs parois au niveau des sites d'infections, notamment par accumulation de callose ou de lignine. Ce phénomène permet de freiner ou d'empêcher la pénétration du champignon dans la cellule en bloquant les points d'insertions des hyphes et appressoriums (Lepoivre, 2003).

La réaction hypersensible (HSR) est un autre mécanisme de défense, qui consiste à induire la mort cellulaire programmée des cellules situées au niveau du site d'infection pour empêcher la progression du pathogène (Lam, 2004). Cette réaction constitue une bonne défense contre les virus et les pathogènes biotrophes mais pas contre les pathogènes nécrotrophes (Glazebrook, 2005).

Un autre mécanisme de défense induite repose sur la production de protéines PR (Pathogen-Related). Ces protéines présentent des activités dirigées de façon directe ou indirecte contre les pathogènes, telles que des chitinases pour la dégradation des parois des champignons (van Loon *et al.*, 2006).

La production de phytoalexines constitue aussi un moyen de défense efficace contre les agents pathogènes. Les phytoalexines sont des molécules du métabolisme spécialisé, de faible



poids moléculaire, dont la synthèse est induite suite à un stress et possédant une activité antimicrobienne (van Etten *et al.*, 1994). Ces molécules peuvent être très variées et peuvent aussi présenter d'autres activités biologiques, contre des virus, des insectes (Sobolev *et al.*, 2007) ou pour protéger de stress oxydants tels que l'exposition aux UVs (Tang *et al.*, 2010).

Chez la vigne, les stilbènes sont les phytoalexines les plus représentées, bien que l'on retrouve aussi une grande variété de flavonoïdes (Ali *et al.*, 2010). Les stilbènes ont été décrits comme ayant des activités antifongiques contre de nombreux pathogènes tels que *Cladosporium cucumerinum*, *Pyricularia oryzae* (Langcake et Pryce 1976), *Plasmopara viticola* (Dercks et Creasy 1989; Langcake, 1981), *Sphaeropsis sapinea* (Celimene *et al.* 2001). De plus, la capacité à produire des stilbènes, en termes de quantité et de rapidité, est corrélée avec la résistance de la vigne à des maladies causées par *Botrytis cinerea* ou *Plasmopara viticola* (Pool *et al.*, 1981). Toutefois la production de resvératrol, le stilbène majoritaire chez la vigne, est affectée par de nombreux facteurs environnementaux, ce qui limite son utilisation comme marqueur de résistance (Barlass *et al.* 1987).

## 4 Les stilbènes principaux chez la vigne et leur biosynthèse

La structure de base des stilbènes est composée de deux noyaux phényl liés entre eux par une double liaison entre deux carbones (1,2-diphényléthylène), leur conférant leur propriété fluorescente sous lumière UV (Charlton et Saltiel, 1977; Heisel *et al.*, 1979). Leur nom, dérivé du grec *stilbos* (briller) leur vient d'ailleurs de cette propriété. Cette structure les rend globalement peu solubles dans l'eau mais solubles dans des solvants organiques tels que l'acétate d'éthyle ou l'éthanol, sauf pour leurs formes glycosylées (Hart, 1981). Ils peuvent exister en conformation *trans* ou *cis*, la forme *trans* étant la plus courante dans la nature (Hart, 1981) et celle montrant le plus d'activité antioxydante (Mérillon *et al.*, 1997).

Chez les plantes ce sont des phytoalexines : des molécules de défenses dont la production est induite par un stress, bien qu'elles soient parfois présentes de façon constitutive chez certaines espèces ou sous-espèces, notamment au niveau des parties pérennes de la plante (bois, écorce) (Wang *et al.*, 2010). Ce sont les molécules de défense identifiées dans 72 espèces végétales, réparties entre 31 genres et 12 familles (Jang *et al.*, 1997). Le stilbène le plus courant, le resvératrol a été découvert dans l'hellébore blanche (*Veratrum album* cv Grandiflorum), d'où provient son nom. Le resvératrol, ainsi que d'autres

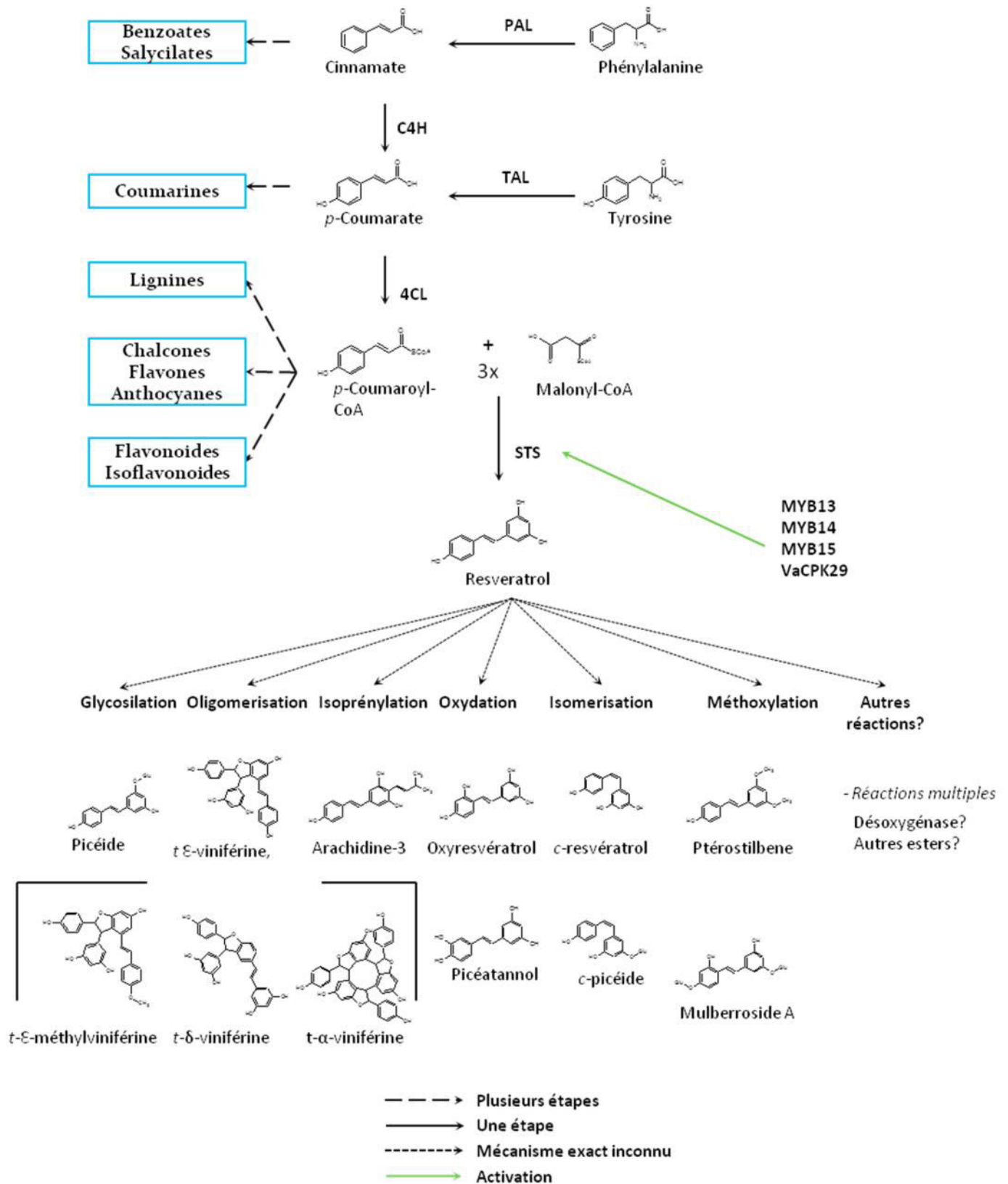


Figure 4 : état des connaissances sur la voie de biosynthèse des stilbènes chez la vigne à partir de la voie de phénylpropanoïdes : biosynthèse et régulation (Chong *et al.*, 2009; Donnez *et al.*, 2011; Ehltling *et al.*, 2006; Hall et De Luca, 2007; Höll *et al.*, 2013; Jeandet *et al.*, 2002; Koukol et Conn, 1961; Langcake et Pryce, 1977a; Lindl *et al.*, 1973; Rolfs et Kindl, 1984; Rosler *et al.*, 1997; Russell et Conn, 1967; Schmidlin *et al.*, 2008; Schöppner et Kindl, 1984; Shin *et al.*, 2012).

stilbènes ont ensuite été décrits dans d'autres espèces parmi lesquelles les plus étudiées sont l'arachide (*Arachis hypogea*), le pin (*Pinus spp.*), la renouée du japon (*Fallopia japonica*) et la vigne (*Vitis spp.*). C'est chez la vigne que cette voie de biosynthèse est la plus importante en termes de variété de dérivés (Parage *et al.* 2012) et la plus étudiée.

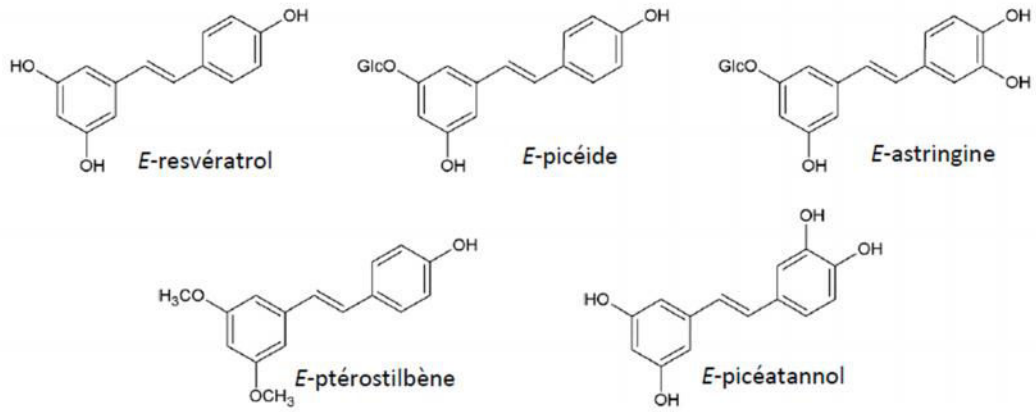
La synthèse de resvératrol s'effectue soit à partir de phénylalanine, soit de tyrosine en 4 ou 3 étapes respectivement (figure 4). La synthèse à partir de la phénylalanine se fait par la voie générale des phénylpropanoïdes décrite précédemment, utilisant la PAL, la C4H puis la 4CL tandis que celle à partir de la tyrosine nécessite la Tyrosine Ammonia Lyase (TAL, EC 4.3.1.23, Shin *et al.*, 2012, Rösler *et al.*, 1997)), formant directement le *p*-coumarate, à son tour converti en *p*-coumaroyl-Coa par la 4CL. La molécule de coumaroyl-CoA est ensuite condensée avec 3 molécules de malonyl-CoA par une stilbène synthase (STS, EC 2.3.1.95, (Rolf et Kindl, 1984)) pour former le resvératrol. Au niveau évolutif les STS dérivent des chalcones synthases (CHS) au cours de plusieurs événements indépendants, ce qui explique leurs fortes homologues de séquences et le fait qu'elles utilisent les mêmes substrats (Parage *et al.*, 2012). Une fois produit, le resvératrol peut subir de nombreuses réactions, dont les plus courantes sont la glycosylation, les oligomérisations et les hydroxylations (figure 4), pour former une grande variété de dérivés différents. Plus d'un millier de ces composés ont été décrits (Houillé, 2015).

Les viniférines sont les oligomères de resvératrol (figure 5) dont les plus représentés chez la vigne sont les et viniférines, des dimères de resvératrol. On retrouve toutefois des stilbènes de type trimériques, tétramériques et plus rarement de degrés de polymérisation plus importants. Leur synthèse se fait à partir du resvératrol et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à l'aide de peroxydases (Takaya *et al.*, 2005) présentes dans la vacuole (Ros Barcelo *et al.* 2003) ou au niveau des tissus conducteurs (Houillé *et al.*, 2015a). Bien que cette activité ait été montrée *in vitro* (Cichewicz et Kouzi, 2002; Hiraga *et al.*, 2001; Langcake et Pryce, 1977a; Wilkens *et al.*, 2010) avec des peroxydases non spécifiques telles que la peroxydase de raifort, aucune peroxydase spécifique à la synthèse des viniférines n'a encore été caractérisée.

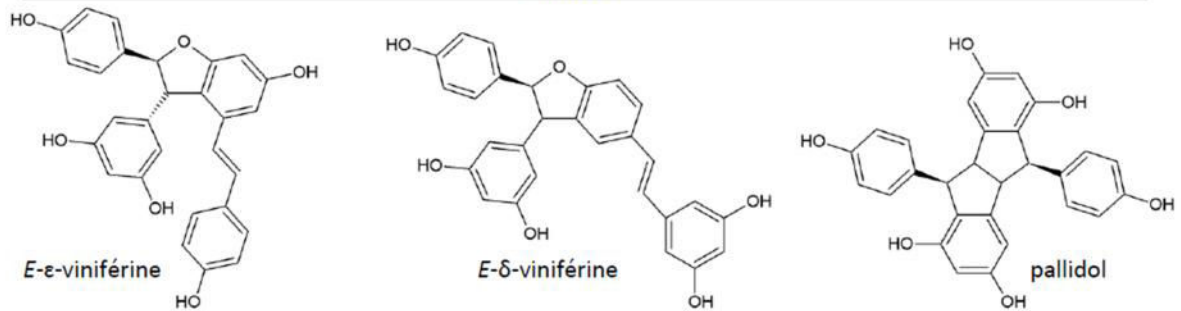
Le picéide est la forme -D-glycosylée du *t*-resvératrol, plus soluble en solution aqueuse du fait de sa polarité plus élevée (Park *et al.*, 2012). C'est probablement une forme de stockage de *t*-resvératrol au niveau de la vacuole. Sa synthèse se fait grâce à la 3-O glucosyltransférase (Hall et De Luca, 2007).

Le ptérostilbène est la forme méthylée du *t*-resvératrol au niveau de ses deux fonctions hydroxyle en position méta. Sa synthèse se fait à partir du *t*-resvératrol et de la S-adenosyl

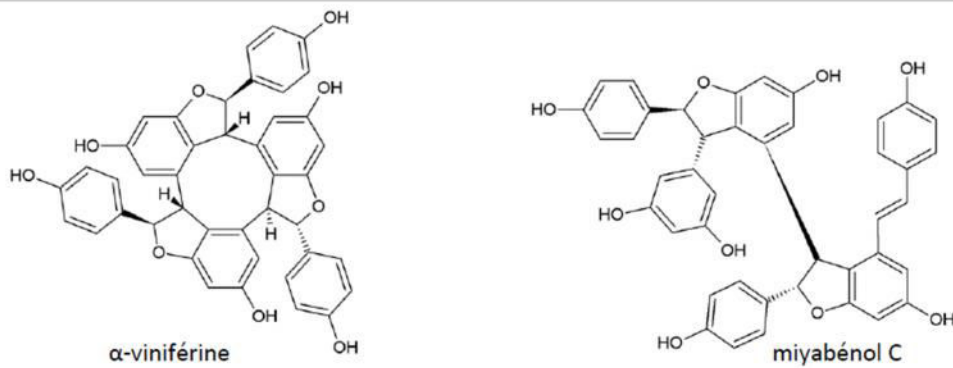
### Monomères



### Dimères



### Trimères



### Tétramères

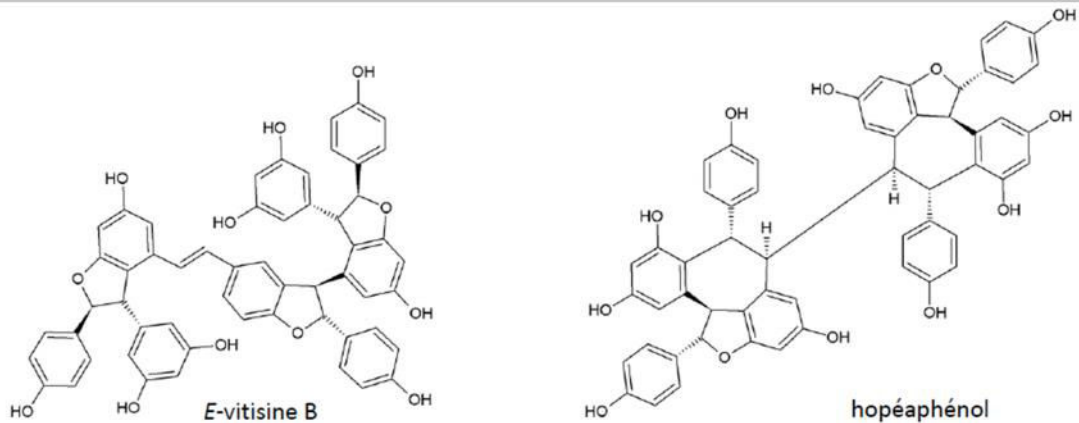


Figure 5 : structure chimique de quelques dérivés de resvératrol (d'après Chastang, 2014). Ici, les configurations E correspondent aux formes *trans* des molécules



méthionine (SAM) avec une Resvératrol O-Methyl Transférase (ROMT) (Schmidlin *et al.*, 2008).

Chez la vigne, tous les stilbènes sont des dérivés du resvératrol (figure 4). L'espèce *Vitis vinifera* L. compte plus de 30 gènes codant pour des stilbènes synthases (Parage, 2013). Très peu d'enzymes ont été montrées comme spécifiquement responsables de la synthèse des dérivés de resvératrol et leurs mécanismes de régulation restent largement inconnus. Ce manque de connaissance et les difficultés rencontrées pour la production de dérivés de resvératrol rendent leur étude plus difficile. En effet, le fait que le coefficient d'extinction des stilbènes ait été montré comme diminuant avec le degré de polymérisation du resvératrol conduit à une sous-évaluation des stilbènes dans les extraits, lorsqu'on les exprime en équivalents de *t*-resvératrol, à défaut des standards correspondants (Lambert *et al.*, 2012).

### **Intérêt et activités des stilbènes**

Les stilbènes possèdent des activités très variées et particulièrement intéressantes d'un point de vue nutraceutique, cosmétique ou pharmaceutique. Les stilbènes observés majoritairement chez la vigne sont le *t*-resvératrol, les  $\xi$  et viniférines et les picéides. Ces derniers sont suffisamment présents, dans la renouée (Chen *et al.*, 2013) ou la vigne (Rayne *et al.*, 2008) par exemple, pour produire des extraits complexes comme ceux actuellement utilisés dans les produits cosmétiques ou les compléments alimentaires à base de stilbènes. Toutefois, une grande variété d'autres stilbènes est aussi présente dans ces plantes mais en concentrations plus faibles. Ces derniers restent actuellement très difficiles à produire en quantités suffisantes pour les purifier et caractériser leurs activités spécifiques.

Le *t*-resvératrol a fait l'objet de beaucoup d'attention depuis une vingtaine d'années, notamment pour ses activités liées à la santé humaine (figure 6). L'intérêt pour les stilbènes s'est rapidement étendu aux différents dérivés du resvératrol et à leurs activités. Les stilbènes possèdent des propriétés pharmaceutiques très marquées (Pezzuto, 2011), comme antioxydants (Castellano *et al.*, 2014 ; De la Lastra et Villegas, 2007 ; Santos *et al.*, 2013) et piègent les radicaux libres (Khanduja et Bhardwaj, 2003). Ce sont aussi des antifongiques et antibactériens (Adrian et Jeandet, 2012 ; Adrian *et al.*, 1997 ; Chalal *et al.*, 2014 ; Houillé *et al.*, 2014 ; Hwang et Lim, 2015 ; Li *et al.*, 2009 ; Paulo *et al.*, 2011) qui possèdent des activités anticancéreuses (Aluyen *et al.*, 2012 ; González-Sarrías *et al.*, 2011 ; Pervaiz et Holme, 2009 ; Wan Zuraida, 2011). D'autres activités du *t*-resvératrol, plus spécifiques ont été décrites telles que anti-VIH (Clouser *et al.*, 2012), neuroprotective (Rege *et al.*, 2014), hépatoprotective

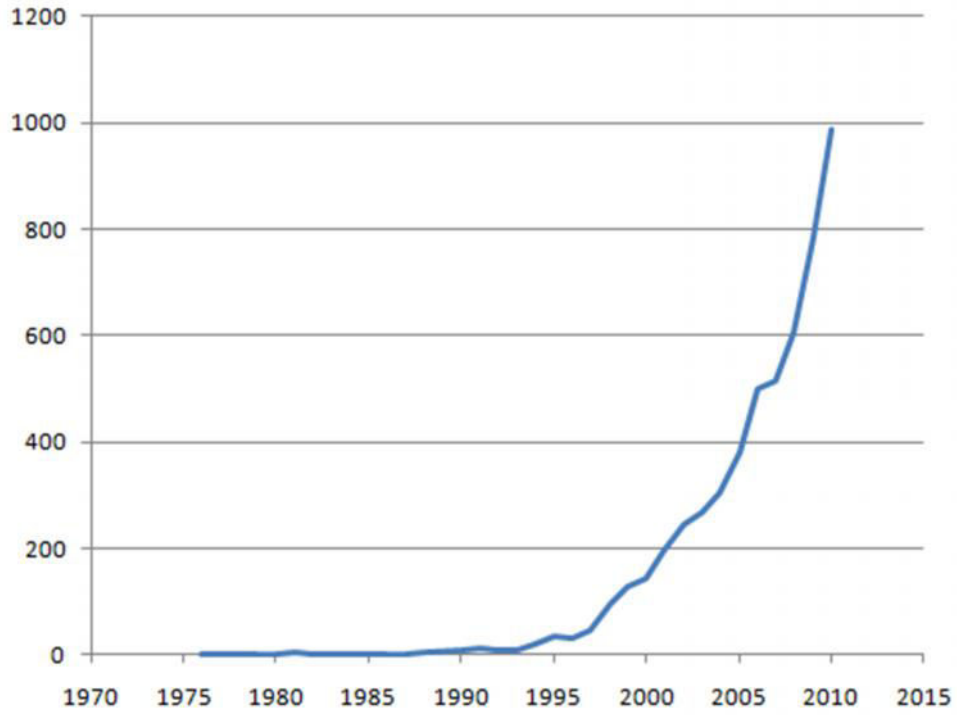


Figure 6 : nombre de publications scientifiques sur le resvératrol au cours du temps (source : Web of Knowledge, 2010).

(Wang *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2014) ou encore sur la longévité (Bhullar et Hubbard, 2015). La forme glycosylée du *t*-resvératrol, le picéide, possède une activité globalement plus faible. Une revue sur l'activité des dérivés de resvératrol a été réalisée en 2006 par Roupe *et al.*, (2006).

L'activité des viniférines est beaucoup moins documentée que celle du *t*-resvératrol mais quelques études montrent des propriétés particulièrement intéressantes qui pourraient surpasser celles du *t*-resvératrol, notamment pour des activités anticancéreuses (Xue *et al.*, 2014).

Le ptérostilbène présente de nombreuses activités (McCormack et McFadden, 2013) mises en évidence sur modèle animal comme anticancéreux mais aussi contre l'hypercholestérolémie et l'hyperlipémie (Mikstacka *et al.*, 2007 ; Rimando *et al.*, 2005). Il permettrait aussi de ralentir le déclin des fonctions cognitives (Joseph *et al.*, 2008). De plus, ses groupements méthyles le rendent plus facilement absorbable par l'organisme et plus stable (Lin *et al.*, 2009).

De nombreux autres stilbènes ont été décrits dans la littérature (Shen *et al.*, 2009) mais très peu ont été caractérisés en terme d'activités d'intérêt cosmétique ou pharmaceutique. La figure 4 illustre les différents types de réactions possibles et donne une liste non exhaustive des stilbènes de la vigne. En effet, la diversité de ces réactions, la possibilité de chaque molécule à subir plusieurs transformations, ainsi que les possibles réactions croisées entre différents stilbènes permettent la synthèse d'une très grande variété de composés.

## 5 Régulation de la biosynthèse des stilbènes

La diversité des stilbènes, ainsi que le nombre de stilbènes synthésés trouvés chez la vigne, laissent supposer que cette voie de biosynthèse est soumise à une régulation complexe (Chong *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2012). La synthèse et l'accumulation du *t*-resvératrol seraient régulées au niveau de la transcription (Chung *et al.*, 2003 ; Fettig et Hess, 1999 ; Jaillon *et al.*, 2007) et de la traduction (Fornara *et al.*, 2008 ; Qiu-Hong Pan, 2009 ; Wang *et al.*, 2010), ainsi que par la disponibilité des précurseurs, dont la phénylalanine et la tyrosine (Manela *et al.*, 2015) voire par l'accumulation de resvératrol.

La production de stilbènes est fortement induite par différents stress biotiques ou abiotiques (Borie *et al.*, 2004). Les stress biotiques peuvent être exercés par infection de la plante avec des bactéries, des champignons ou lorsqu'elle est agressée par des herbivores. Les

Tableau 1 : effet de différents éliciteurs sur la production de *t*-resvératrol par des cellules de 41B (*Vitis vinifera L.* x *Vitis berlandieri L.*) (Donnez, 2010).

Traitements		Résultats
Eliciteur	UV	Difficile à mettre en place en culture liquide stérile, les UV ne semblent pas pénétrer en profondeur le milieu.
	Acide salicylique	N'induit pas la synthèse de <i>t</i> -resvératrol (Donnez, 2006).
	Rhamnolipides	Mort rapide des cellules, ne semble pas induire la synthèse de <i>t</i> -resvératrol (Courteaux, 2007).
	Alanine	Ne montre ni d'effet direct, ni synergique avec le MeJA sur la synthèse de <i>t</i> -resvératrol.
	Chitosan	Ne montre ni d'effet direct, ni synergique avec le MeJA sur la synthèse de <i>t</i> -resvératrol.
	Sodium orthovanadate	Eliciteur intéressant mais molécule connue pour bloquer les transports actifs, risque de limitation de l'excrétion du <i>t</i> -resvératrol dans le milieu.
	Méthyl jasmonate	Eliciteur ayant montré la meilleure induction de <i>t</i> -resvératrol (Donnez <i>et al.</i> , 2011).
	Chitosan	Augmentation de la croissance d'un facteur de 1,5 fois avec une concentration de 10 mg/l de chitosan.
Déplacement d'équilibre chimique	Acétate d'éthyle	Bon isolement du <i>t</i> -resvératrol, introduire l'acétate d'éthyle après élicitation pour permettre le contact entre le MeJA et les cellules.
	Soutirage et ajout de nouveau milieu	Essai intéressant pour le maintien de la production de <i>t</i> -resvératrol sur 9 jours mais la quantité obtenue est faible.
	Boudin de dialyse avec résine de Séphadex	Stress important des cellules qui induit une perte de viabilité, liée à la modification de l'agitation.
	Résines Amberlite XAD1600	Ces résines peuvent-être utilisées directement dans le milieu mais la séparation des billes de résine et des cellules est complexe, car les billes et les cellules ont une taille et une masse équivalentes. Toutefois elles semblent très efficaces pour le piégeage de <i>t</i> -resvératrol.

stress abiotiques regroupent les stress liés à l'environnement : la température, l'eau, les nutriments (N, P, K et C notamment), le pH, les sels (tels que  $AlCl_3$ , (Adrian *et al.*, 1996), les UV (Guerrero *et al.*, 2010), les contraintes mécaniques, les blessures ou à des composés reconnus par les mécanismes de défense (Chung *et al.*, 2003).

L'expression des gènes de la *STS* et la production de stilbènes ont elles aussi été décrites comme activées par des hormones de stress des plantes, telles que l'éthylène, l'acide jasmonique ou l'acide salicylique et par différents stress (Lu *et al.*, 2012), capables d'induire l'expression des gènes en amont de la biosynthèse du *t*-resvératrol en plus de la *STS* : la *PAL*, la *C4H* et la *4CL*. Ceci va ainsi favoriser la formation de stilbènes par la production de ses précurseurs tels que la phénylalanine (Riedel *et al.*, 2014 ; Yue *et al.*, 2011) ou le coumarate (Shumakova *et al.*, 2011). L'expression de ces gènes est inductible par de nombreux traitements éliciteurs ou des stress biotiques et abiotiques. L'expression du gène *C4H* a été montrée comme souvent finement coordonnée avec celle du gène de la *PAL* (Mizutani *et al.*, 1997). De plus, le fait que ces deux enzymes soient en partie co-localisées au niveau des membranes du réticulum endoplasmique (Achnine *et al.*, 2004 ; Lu *et al.*, 2012) permet une régulation fine du flux dans cette voie métabolique.

D'autres moyens d'induire la formation de molécules d'intérêt dans des procédés de culture *in vitro* de cellules en suspension est de les retirer du milieu au fur et à mesure de leur synthèse afin d'éviter un effet de rétroinhibition ou une éventuelle toxicité sur les cellules. L'utilisation de résines de type XAD ou d'acétate d'éthyle ont par exemple été testés sur des cultures de cellules de vigne en suspension (Donnez, 2010) mais leur application pose des problèmes techniques tels que la modification de l'agitation ou la perte de viabilité due au contact avec le solvant. La forte affinité de la cellulose pour les stilbènes est prometteuse (Takagai *et al.*, 2005) mais son application à des cultures productrices de resvératrol n'a encore jamais été réalisée.

Certaines de ces approches ont été testées précédemment afin d'optimiser la production de *t*-resvératrol dans des cultures de cellules de vigne en suspension (tableau 1). Les inducteurs ayant montré les résultats les plus prometteurs pour la production de stilbènes avec des systèmes végétaux sont le méthyl jasmonate (MeJA) ainsi que les cyclodextrines (CDs).

L'introduction d'un gène codant la *STS* chez *Nicotiana tabacum* et *Oryza sativa* L. ne produisant pas de stilbènes est suffisante pour induire la biosynthèse de *t*-resvératrol et augmenter la résistance de la plante aux maladies causées par à *Botrytis cinerea* et *Pyricularia oryzae* ou *Xanthomonas oryzae* respectivement (Hain *et al.*, 1990, 1993 ; Tian *et al.*, 1998). Bien que cette observation prouve que la biosynthèse des stilbènes peut être régulée par les



défenses générales de la plante, il est probable qu'une régulation plus spécifique soit présente. En effet, des modifications mineures de la STS peuvent conduire à des changements au niveau de son activité, notamment de spécificité de substrat et donc à une variété de nouveaux produits de biosynthèse (Morita *et al.*, 2001). La diversité de gènes codant des STS chez la vigne donne lieu à une variété de séquences dont les différences peuvent affecter leur régulation et leur rôle.

L'accumulation des ARNm, de la STS et de son produit, le *t*-resvératrol après exposition de la plante aux UV se fait en deux temps, après 16 h et 24 h. Ces observations ont pu être réalisées sur Cabernet Sauvignon (Wang *et al.*, 2010), Pinot noir, Chardonnay (Borie *et al.*, 2004) et cellules de vigne en suspension (Jeandet *et al.*, 2010 ; Liswidowati *et al.*, 1991 ; Wiese *et al.*, 1994). Ceci suggère l'existence d'au moins deux groupes de STS : le premier, dont les gènes sont exprimés de façon précoce avec une dégradation rapide des ARNm et le second, plus lent mais aux ARNm plus stables (Liswidowati *et al.*, 1991 ; Wiese *et al.*, 1994). Wang *et al.* (2010) ont montré une accumulation précoce de *t*-resvératrol, après traitement de jeunes plants de Cabernet Sauvignon aux UV, sans accumulation notable de STS ni de son ARNm. Ceci suppose une expression constitutive de *STS* (Parage, 2013) permettant d'assurer une réponse de défense rapide. La biosynthèse de *t*-resvératrol est donc modulée en deux temps, au niveau transcriptionnel et traductionnel, améliorant ainsi le potentiel de défense de la plante (Liswidowati *et al.*, 1991 ; Wiese *et al.*, 1994). A ceci s'ajoute le fait que les enzymes responsables de la formation des dérivés de resvératrol (peroxydases, oxydases, glycosyltransférases et autres) n'ont pas nécessairement une spécificité très marquée (Rasmussen et Dixon, 1999), ce qui peut créer une variété de nouveaux stilbènes possibles et donc un niveau de régulation supplémentaire dans leur biosynthèse.

Les mécanismes exacts de régulation de l'expression des gènes de la STS et de l'activité de ces protéines sont à l'heure actuelle très mal connus. En effet, seuls trois facteurs de transcription, MYB13, MYB14 et MYB15, ont été décrits comme activant spécifiquement les promoteurs des gènes de *STS* (Höll *et al.*, 2013, Wong *et al.*, 2016). Les auteurs ont montré une augmentation de l'expression des gènes codant des STS et une accumulation de picéide dans des racines transformées de *V. vinifera* cv. Chardonnay surexprimant *MYB14* et *MYB15*. Les Protéines Kinases Calcium Dépendantes (CPK) et plus spécifiquement la protéine CPK20 ont aussi été décrites comme activant *STS7*, menant à la biosynthèse de *t*-resvératrol chez *Vitis amurensis* (Aleynova-Shumakova *et al.*, 2014). La même équipe a ensuite montré que la





protéine CPK29 était aussi capable de réguler positivement la synthèse de *t*-resvératrol. Par opposition, les protéines CPK9, 13 et 21 ne semblent pas impliquées dans cette voie de biosynthèse dans cette plante (Aleynova *et al.*, 2014). Les STS dérivent des chalcone-synthases (CHS) au niveau évolutif ; ces deux enzymes, de séquences relativement proches et ayant les mêmes substrats, ont été montrées comme régulées de façon diamétralement opposée chez la vigne (Vannozzi *et al.*, 2012). Bien que ce ne soit pas le cas pour tous les couples STS/CHS, la STS3 a même été montrée comme capable d'inhiber l'activité de la CHSX *in vitro* chez *Pinus densiflora* (Kodan *et al.*, 2002).

## 6 La production de stilbènes

Parmi tous les stilbènes, seuls le *t*-resvératrol, le picéide, le ptérostilbène et l' -viniférine, picéatannol, oxyresvératrol et la pinosylvine sont actuellement disponibles sous forme purifiée sur le marché. Bien que leur achat soit possible, il semblerait que leur approvisionnement soit difficile et ne permette pas de les maintenir en permanence en vente mis à part pour le *t*-resvératrol (disponibilités Sigma-Aldrich). La plupart des stilbènes, tels que les autres viniférines restent principalement commercialisés en mélange, sous forme d'extraits complexes pour des utilisations cosmétiques (Caudalie, Dior, Lancôme) ou compléments alimentaires (EA Pharma, ARKOPHARMA). La variété de produits cosmétiques et nutraceutiques à base de stilbènes déjà présents sur le marché montre bien l'intérêt de ces molécules mais aussi qu'aucun des modes de production actuels ne parvient à répondre aux critères stricts de l'industrie pharmaceutique. Malgré ces difficultés, un certain nombre de solutions ont été proposées pour la production de différents stilbènes.

### 6.1 Approche par extraction directe

Actuellement, la majorité du resvératrol présent sur le marché est extrait de la renouée du Japon (*Fallopia japonica*), une plante envahissante d'origine asiatique. Cette plante produit jusqu'à 13 mg/g MS de picéide (Chen *et al.*, 2013), qui est extrait, purifié et hydrolysé pour donner du *t*-resvératrol (Wang *et al.*, 2013 ; Vastano *et al.*, 2000 ; Waterhouse et Lamuela-Raventós, 1994). Les extraits produits de cette façon ne contiennent pas d'autres dérivés de resvératrol tels que l' -viniférine (Wang *et al.*, 2013 ; Be ová *et al.*, 2008).

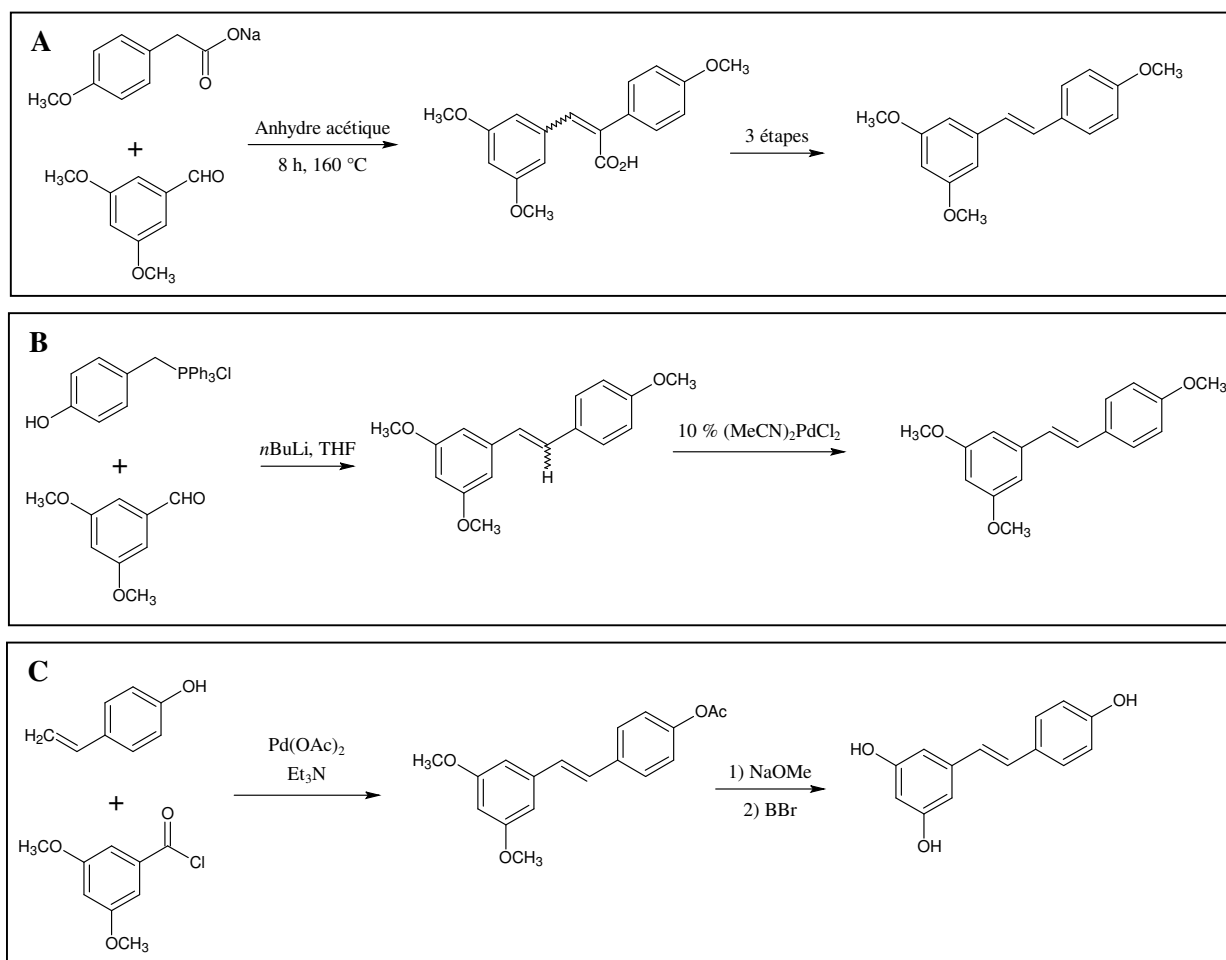


Figure 7 : synthèse chimique du resvératrol, **A** : par la réaction de Perkin (Fan *et al.*, 2010), **B** : par la réaction de Wittig (Sprouse, 2009) **C** : par la réaction de Heck (Andrus et Meredith, 2001)

Une partie des stilbènes produits provient aussi des sarments de vigne, qui contiennent du *t*-resvératrol mais surtout des dérivés moins communs tels que des di, tri et tétramères de resvératrol (Gorena *et al.*, 2014 ; Lambert *et al.*, 2013 ; Pawlus *et al.*, 2013). Les sarments sont des déchets viticoles récoltés une fois par an et peuvent être stockés pendant plusieurs mois au cours desquels leur teneur en stilbènes et notamment en viniférines, va augmenter (Gorena *et al.*, 2014 ; Houillé *et al.*, 2015b). Les concentrations en *t*-resvératrol et en -viniférine mesurées sont très variables entre les cépages, terroirs et du fait des différentes méthodes d'extraction utilisées. Ces concentrations varient de quelques mg/kg de matière sèche (MS) à plus de 6,5 g/kg MS pour le *t*-resvératrol (Vergara *et al.*, 2012) et 3,7 g/kg MS pour les viniférines (Lambert *et al.*, 2013).

## 6.2 Approche par synthèse chimique

La synthèse chimique de *t*-resvératrol (figure 7) a été décrite utilisant plusieurs méthodes mais elles nécessitent habituellement des étapes complexes et/ou à fort impact environnemental. Les approches testées peuvent être séparées en deux catégories (i) la synthèse biomimétique, cherchant à imiter les mécanismes biologiques et (ii) la synthèse *de novo*, sans lien avec la biologie des molécules. La première catégorie est habituellement utilisée pour élucider des mécanismes biologiques, en caractérisant les intermédiaires réactionnels par exemple, en opposition à la seconde catégorie, mieux adaptée à la synthèse totale (Keylor *et al.*, 2015).

La réaction de Perkin, la condensation d'un aldehyde aromatique et un acide carboxylique, a été une des premières utilisées pour la synthèse de triméthyl-resvératrol (figure 7A), ensuite décarboxylé pour obtenir le resvératrol (Späth *et al.*, 1941). Malheureusement, cette réaction nécessite de nombreuses étapes telles que la protection, condensation, décarboxylation et déprotection nécessitant des conditions de réactions extrêmes (températures élevées, utilisation de métaux lourds), ce qui peut limiter son utilisation (Fan *et al.*, 2010).

La réaction de Wittig (figure 7B) est la plus communément utilisée pour la synthèse de resvératrol, réalisée pour la première fois par Moreno-Manas et Pleixatas (1985). C'est l'addition d'un composé organophosphoré et un aldéhyde ou une cétone. L'inconvénient majeur de cette méthode est le manque de stéréospécificité, malgré les améliorations récentes réalisées sur ce point (Fan *et al.*, 2010).

Tableau 2 : utilisation de microorganismes pour la production de *t*-resvératrol (Donnez *et al.*, 2009 ; Jeandet *et al.*, 2012 et Parage, 2013).

Microorganisme Espèces	Gènes introduits	Origine des gènes	Concentration en <i>t</i> -resvératrol	Références
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>PAL/TAL, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i> ( <i>PAL/TAL</i> ), <i>Streptomyces coelicolor</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis</i> sp. ( <i>STS</i> )	1,46 mg/l	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PAL, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>PAL, C4H, 4CL</i> ), <i>Rheum tataricum</i> ( <i>STS</i> )	non détectable	Katz <i>et al.</i> , 2008
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>TAL, protéine de fusion 4CL::STS</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ( <i>TAL</i> ), <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	5,25 mg/l	Zhang <i>et al.</i> , 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	1,45 mg/l	Becker <i>et al.</i> , 2003
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	5,8 mg/l	Beekwilder <i>et al.</i> , 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	262–391 mg/l	Sydor <i>et al.</i> , 2010
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Phénylalanine ajoutée	<i>PAL, CPR, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i> ( <i>PAL, CPR</i> ), <i>Glycine max</i> ( <i>C4H, 4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	0,29 mg/l	Trantas <i>et al.</i> , 2009
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , acide p-coumarique ajouté	<i>PAL, CPR, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Populus trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i> ( <i>PAL, CPR</i> ), <i>Glycine max</i> ( <i>C4H, 4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	0,31 mg/l	Trantas <i>et al.</i> , 2009
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>TAL, protéine de fusion 4CL::STS, Transporteur araE</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ( <i>TAL</i> ), <i>Escherichia coli</i> ( <i>araE</i> ), <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	3,1 mg/l 1,27 mg/l (sans <i>araE</i> )	Wang <i>et al.</i> , 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>TAL, protéine de fusion 4CL::STS</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ( <i>TAL</i> ), <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	14,4 mg/l	Wang et Yu, 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>PAL, C4H, 4CL, STS</i>	<i>Rhodospiridium. toruloides</i> ( <i>PAL</i> ), <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>C4H, 4CL</i> ), <i>Arachis Hypogaea</i> ( <i>STS</i> )	5,8 mg/l	Shin <i>et al.</i> , 2012
<i>Escherichia coli</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis</i> sp. ( <i>STS</i> )	3,6 mg/l	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>Escherichia coli</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Arachis hypogaea</i> ( <i>STS</i> )	100 mg/l	Watts <i>et al.</i> , 2006
<i>Escherichia coli</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	16 mg/l	Beekwilder <i>et al.</i> , 2006
<i>Escherichia coli</i> , avec acide p-coumarique	<i>4CL, STS, ACC</i>	<i>Lithospermum erythrorhizon</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Arachis hypogaea</i> ( <i>STS</i> ), <i>Corynebacterium glutamicum</i> ( <i>ACC</i> )	171 mg/l	Katsuyama <i>et al.</i> , 2007
<i>Escherichia coli</i>	<i>TAL, 4CL, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Rhodobacter capsulatus</i> ( <i>TAL</i> ), <i>Rheum tataricum</i> ( <i>STS</i> )	-	Katz <i>et al.</i> , 2008
<i>Escherichia coli</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	2462 mg/l (avec céruleine) 1 380 mg/l	Lim <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptomyces venezualae</i>	<i>4CL, STS</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Arachis hypogaea</i> ( <i>STS</i> )	0,4 mg/l (avec acide coumarique)	Park <i>et al.</i> , 2009
<i>Escherichia coli</i>	<i>TAL, 4CL, STS</i>	<i>Saccharothrix. espanaensis</i> ( <i>TAL</i> ), <i>Streptomyces coelicolor</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Arachis hypogaea</i> ( <i>STS</i> )	1,6 mg/l	Choi <i>et al.</i> , 2011
<i>Escherichia coli</i>	<i>TAL, 4CL, STS</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i> ( <i>TAL</i> ), <i>Petroselinum crispum</i> ( <i>4CL</i> ), <i>Vitis vinifera</i> ( <i>STS</i> )	35,02 mg/l	Wu <i>et al.</i> , 2013

La réaction de Heck (figure 7C) est une autre réaction communément utilisée pour la synthèse chimique de stilbènes du fait de sa chemosélectivité (Ferré-Filmon *et al.*, 2004). Elle a de plus été utilisée pour la synthèse de dimères (Jeffrey et Sarpong, 2009 ; Klotter et Studer, 2014) et tétramères de resvératrol (Snyder *et al.* 2007 ; 2011a et 2011b). Elle consiste en une réaction entre un dérivé halogéné et un alcène catalysée par du palladium. Cette réaction produit par contre des déchets halogénés, toxiques et difficiles à recycler.

D'autres méthodes ont aussi été proposées (Likhtenshtein, 2009) chacune présentant des avantages et inconvénients. Les inconvénients majeurs peuvent être le manque de stéréospécificité, les conditions de pH ou de températures extrêmes, l'utilisation de réactifs coûteux ainsi que la toxicité des réactifs ou des co-produits. Ces éléments représentent encore des freins importants à l'application de ce type de méthodes à l'échelle industrielle et pour une utilisation dans le domaine de la santé. Par contre, les méthodes de synthèse chimique permettent d'obtenir des dérivés non naturels ou de dériver des composés naturels pour accéder à de nouvelles activités (Giacomini *et al.*, 2016 ; Zhong *et al.*, 2013).

### 6.3 Approche par biotechnologies microbiennes

Les microorganismes utilisés pour la production de métabolites d'intérêt présentent de nombreux avantages, notamment d'être facilement modifiables génétiquement (Beekwilder *et al.*, 2006 ; Donnez *et al.*, 2009 ; Marienhagen et Bott, 2013). Ils sont de plus facilement cultivables à grande échelle et dans des conditions parfaitement maîtrisées, ce qui les rend particulièrement attractifs pour l'industrie.

Des études ont montré que la production de *t*-resvératrol était possible dans des systèmes bactériens et de levures (tableau 2). De plus, la compagnie Evolva (Reinach, Suisse) a annoncé en 2014 le lancement de la production industrielle de *t*-resvératrol par des levures, confirmant la viabilité de ce type de système.

Des modélisations réalisées pour une souche d'*E. coli* productrice de *t*-resvératrol avec redirection des flux de carbone vers la voie des stilbènes montrent qu'il serait possible d'atteindre des concentrations de 1,6 g/l de *t*-resvératrol dans le milieu (Bhan *et al.*, 2013). Toutefois, malgré les efforts réalisés sur ces systèmes et les résultats obtenus pour le *t*-resvératrol, la difficulté à produire d'autres stilbènes, ainsi que leurs faibles rendements ne permettent pas encore d'envisager leur production à l'échelle industrielle. Un autre inconvénient de cette technologie est qu'elle se base sur l'utilisation d'Organismes Génétiquement Modifiés (OGMs), encore mal perçus par le grand public.

Tableau 3 : tableau récapitulatif des systèmes de végétaux autres que cellules en suspension pour la production de stilbènes.

Espèce végétale	Culture	Elicitation / Induction	Resvératrol extracellulaire	Resvératrol intracellulaire	Références	
<i>Arachis hypogea</i>	Racines transformées	Acétate de sodium	0,098 mg/g MS	-	Medina-Bolivar <i>et al.</i> , 2007	
	Racines transformées	-	0,002 mg/g MS	-		
	Racines transformées	-	0,8-1,5 mg/g MS	-	Kim <i>et al.</i> , 2010a	
	Racines transformées	UV	-	12 µg/g MF	Ku <i>et al.</i> , 2005	
<i>Vitis rotundifolia Michx</i>	Racines transformées	MeJA	50 nmol/g DW	350 nmol/g MS	Nopo-Olazabal <i>et al.</i> , 2013	
	Racines transformées	-	< 3 nmol/g DW	50 nmol/g MS		
	Racines transformées	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		95 nmol g MS	Nopo-Olazabal <i>et al.</i> , 2014	
<i>Vitis amurensis cv Rupr</i>	Cals	SA, MeJA, gènes <i>rolB</i> ou <i>rolC</i>	-	0,15-3,15 % MS, soit 15 à 315 mg/l	Dubrovina <i>et al.</i> , 2010 ; Isaeva et Kiselev, 2010 ; Kiselev <i>et al.</i> , 2007	
	Cals	Sodium nitropusside	-	0,15 % MS		Kiselev <i>et al.</i> , 2007
	Cals	<i>rolB</i>	-	3,15% MS, soit 33 mg/g MS		Kiselev <i>et al.</i> , 2007
<i>Vitis thunbergii cv Sieb. Et Zucc.</i>	Cals	acide -naphtalène acétique et 6-benzyl-aminopurine	-	3,7 mg/g MS (stilbènes totaux)	Kiselev <i>et al.</i> , 2007	

## 6.4 Approche par biotechnologies végétales

Les biotechnologies végétales sont mieux adaptées à la production de molécules complexes. Bien que les plantes soient plus difficiles à transformer et que leur croissance soit beaucoup plus lente que les microorganismes utilisés habituellement, leur capacité de production dans des conditions d'induction (Murthy *et al.*, 2014 ; Jeandet *et al.*, 2016) peut néanmoins les rendre tout à fait compétitives. Ce type de traitement impose une culture en deux temps, avec une phase de croissance en conditions optimales et une phase de production en conditions d'induction. L'optimisation des conditions de culture et l'induction de cellules, tissus ou organes d'espèces naturellement productrices permet d'obtenir de bons rendements de production ainsi qu'une variété plus importante de stilbènes sans nécessairement avoir recours à la transgénèse (tableau 3). Ces cultures sont réalisées en milieu confiné, permettant de suivre et maîtriser au mieux les paramètres de culture, limitant ainsi toute contamination et influence de l'environnement extérieur (Thorpe, 2007).

Le procédé de production développé au laboratoire de Stress, Défenses et Reproduction des Plantes (SDRP) consiste à cultiver des cellules de *V. labrusca* en suspension, puis d'induire la production et la sécrétion massive de stilbènes dans le milieu par élévation (Jeandet *et al.*, 2016). Les traitements au MeJA en combinaison avec des cyclodextrines sont ceux ayant montré les meilleurs rendements pour la production de stilbènes. Les volumes de culture varient de 100 ml à 10 l et la production peut atteindre 4 g/l de stilbènes dans le milieu en présence de cyclodextrines et avec un traitement au méthyl jasmonate. Ce procédé comporte toutefois plusieurs inconvénients : les cellules sont maintenues à un stade dédifférencié grâce à l'ajout d'hormones dans le milieu, ce qui peut les rendre génétiquement et phytochimiquement moins stables (Chattopadhyay *et al.*, 2002 ; Qu *et al.*, 2005, 2006) que dans une organisation en tissus ou en organes et qui impose de réinitier les cultures périodiquement pour éviter cette dérive. Leur élévation conduit à une forte production de stilbènes mais provoque aussi rapidement une perte de viabilité des cellules, vérifiée par coloration au Fluorescein Diacetate (FDA) (résultats non montrés), et suggérée par le brunissement des cultures. Ce brunissement est probablement dû à l'oxydation de polyphénols (figure 8).

### **Induction de la production des stilbènes par le méthyl jasmonate et les cyclodextrines**

L'acide jasmonique est un messager secondaire dans la défense des plantes contre des agresseurs (Creelman et Mullet, 1997). Sa synthèse est induite lors de l'attaque d'un

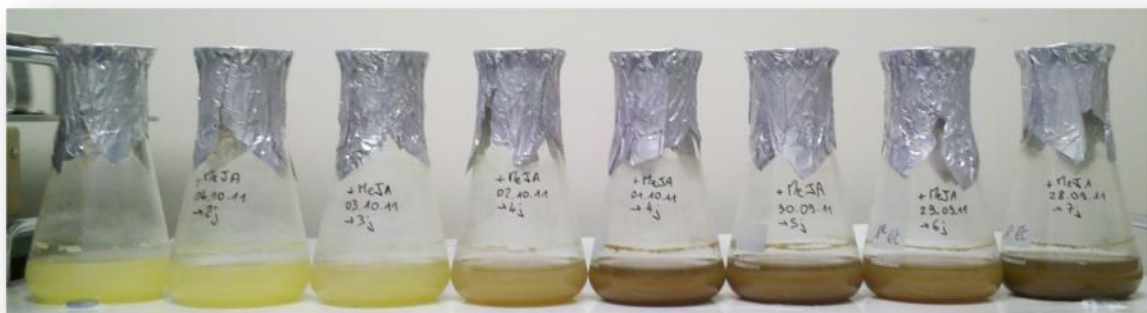


Figure 8 : évolution d'une suspension de cellules après élicitation. De gauche à droite : évolution d'une culture de cellules de *Vitis labrusca* cv. Concord traitées avec 250  $\mu$ M de MeJA pendant une semaine.

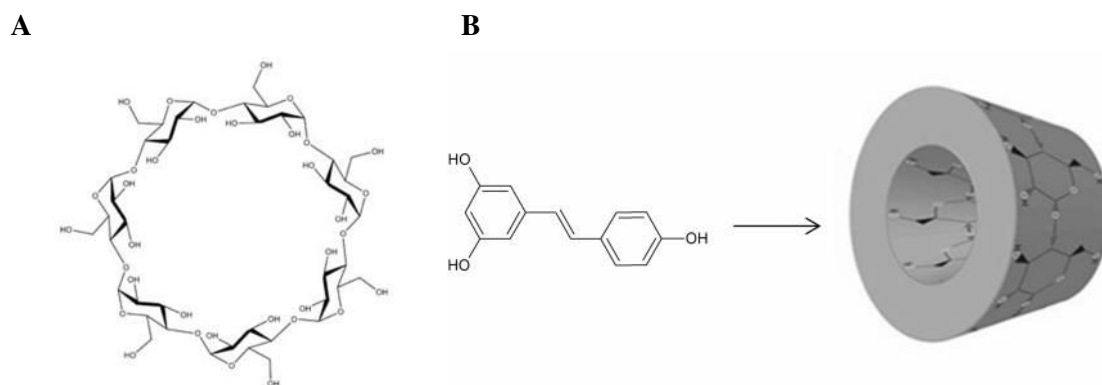


Figure 9 : **A** : structure d'une cyclodextrine. **B** : formation du complexe cyclodextrine-*t*-resvératrol.



pathogène, menant à l'activation de nombreux gènes codant pour la production de métabolites de défense (Ballaré, 2011 ; Cheong et Choi, 2003). Son ajout dans le milieu, sous forme de méthyl jasmonate (plus soluble et moins toxique), permet d'induire la formation de stilbènes chez la vigne. Son utilisation induit la synthèse de *t*-resvératrol mais aussi de ses dérivés (Donnez, 2010 ; Chastang, 2014).

Les cyclodextrines ont aussi été décrites comme induisant la production de *t*-resvératrol et de ses dérivés (Bru *et al.*, 2006 ; Bru Martinez et Pedreno Garcia, 2006). Ces molécules sont des oligomères cycliques de glucopyranose liés en  $\alpha$ -(1,4) (figure 9A). Les plus courantes sont les  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -cyclodextrines, composées de 6, 7 ou 8 sous unités respectivement. Les groupements hydroxyles exposés peuvent servir à greffer des groupements chimiques tels que des groupements méthyl et ainsi modifier les propriétés de solubilité et d'affinité avec les autres molécules en solution. Cette structure cyclique leur permet de former des complexes d'inclusion avec de nombreuses molécules hydrophobes, dont le *t*-resvératrol (figure 9B) et ainsi de les protéger en empêchant leur dégradation. De la même façon, ce mécanisme de captage du *t*-resvératrol déplace l'équilibre entre les différents compartiments contenant du *t*-resvératrol, favorisant son excrétion.

La très grande solubilité des cyclodextrines en solution aqueuse et la tolérance des cellules vis-à-vis de celles-ci permettent d'en ajouter de grandes quantités dans le milieu de culture. Elles ont un effet synergique important avec le MeJA sur les cultures de cellules en suspension (Lijavetzky *et al.*, 2008), permettant d'atteindre des concentrations allant jusqu'à plusieurs g/l alors que la solubilité du *t*-resvératrol en solution aqueuse est d'environ 30 mg/l. Les cyclodextrines méthylées sont celles induisant une production maximale de stilbènes. La revue en Annexe 1 traite plus en détails de l'utilisation des cellules de vigne pour la production de stilbènes.

Les stilbènes captés par les cyclodextrines conservent leur activité (Lucas-Abellán *et al.*, 2007). Ces propriétés de stabilisation et de solubilisation de principes actifs tout en maintenant l'activité en font d'excellentes molécules pour la formulation (Rasheed *et al.*, 2008).

## 6.5 Production de stilbènes pour la défense des plantes

L'intégration de gènes spécifiques à la voie de biosynthèse des stilbènes a aussi été utilisée dans d'autres espèces végétales, pour tenter d'améliorer les défenses de la plante

Tableau 4 : gènes de stilbène synthèses et promoteurs utilisés pour transformer des plantes, leurs effets et activités. (Delaunoy *et al.*, 2009).

Espèce	Gène	Promoteur	Composés produits	Stilbènes (µg/g MF)	Activité biologique	Référence
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	<i>Arachis hypogea</i> (STS)	Stress inducible	<i>t</i> -resvératrol	-	-	Hain <i>et al.</i> , 1990
	<i>Vst1</i> et <i>Vst2</i>	<i>Vst1</i>	<i>t</i> -resvératrol	400	Résistance à <i>Botrytis cinerea</i>	Hain <i>et al.</i> , 1993
	STS chimérique	CaMV35S	Resvératrol	50-290	Morphologie de la fleur altérée, stérilité mâle	Fischer <i>et al.</i> , 1997
<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>Vst1</i> et <i>Vst2</i>	<i>Vst1</i> (+35S-4x)	-	-	Résistance à <i>Botrytis cinerea</i>	Leckband et Lörz, 1998, Liang <i>et al.</i> , 2000
	STS chimérique	Ubiquitine de Maïs	Resvératrol	2	-	Fettig et Hess, 1999
	<i>Vst1</i> et <i>Vst2</i>	<i>Vst1</i> (+35S-4x)	Dérivés inconnus de stilbènes	35-190	Résistance à <i>Puccinia recondita</i> et <i>Septoria nodorum</i>	Serazetdinova <i>et al.</i> , 2005
<i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>Vst1</i>	<i>Vst1</i> (+35S-4x)	-	-	Résistance à <i>Botrytis cinerea</i>	Leckband et Lörz, 1998
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>Arachis hypogea</i> STS (AhRS)	CaMV35S	<i>t</i> -picéide	0,5-20	Résistance à <i>Phoma medicaginis</i>	Hipskind et Paiva, 2000
<i>Arabidopsis thaliana</i> L.	<i>SbSTS1</i>	CaMV35S	<i>t</i> - et <i>c</i> -picéide	584	-	Yu <i>et al.</i> , 2005, 2006
<i>Actinidia deliciosa</i>	<i>pSV25</i>	CaMV35S	<i>t</i> -picéide	20-182	Pas de résistance contre <i>Botrytis cinerea</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 2000
<i>Vitis vinifera</i> L.	<i>Vst1</i>	<i>ms</i> PR10.1	Resvératrol	2,6	Résistance à <i>Botrytis cinerea</i> ( <i>in vitro</i> )	Coutos-Thevenot, 2001
	<i>Vitis pseudoreticulata</i> (STS)	CaMV35S	Resvératrol	-	-	Chaohong <i>et al.</i> , 2007
<i>Malus domestica</i> Borkh.	<i>Vst1</i>	<i>Vst1</i>	Glucoside de resvératrol inconnu	3-7 (non UV irradiated)	-	Szankowski <i>et al.</i> , 2003
	<i>Vst1</i>	<i>Vst1</i>	<i>t</i> -picéide	23-62 (UV irradiated)	Pas d'influence sur les autres composés phénoliques	Rühmann <i>et al.</i> , 2006
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	<i>Vst1</i> et <i>Vst2</i>	<i>Vst1</i>	Resvératrol	-	Résistance à <i>Phytophthora infestans</i> , pas de résistance contre <i>Botrytis cinerea</i> ni <i>Alternaria solani</i>	Thomzik <i>et al.</i> , 1997
	<i>StSy</i>	CaMV35S	<i>t</i> -resvératrol et <i>t</i> -picéide	4-53.	Augmentation de l'activité antioxydante globale	Giovinazzo <i>et al.</i> , 2005
	<i>StSy</i>	CaMV35S	<i>t</i> -resvératrol et <i>t</i> -picéide	0,1-1,2	Amélioration de l'activité antiradicalaire	Morelli <i>et al.</i> , 2006
	<i>StSy</i>	CaMV35S	<i>t</i> - et <i>c</i> -resvératrol et <i>t</i> - et <i>c</i> -picéide	0,42-126 (selon le murissement et l'échantillon)	Changement dans les concentrations de la rutine, naringénine et acide chlorogénique	Nicoletti <i>et al.</i> , 2007
<i>Oryza sativa</i> L.	<i>Vst1</i>	<i>Vst1</i>	-	-	Résistance à <i>Pyricularia oryzae</i> ?	Stark-Lorenzen <i>et al.</i> , 1997
<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.	<i>AhRS3</i>	CaMV35S	Resvératrol et picéide	22-116, jusqu'à 650 en conditions de stress	Capacités antioxydantes, résistance à <i>Fusarium oxysporum</i>	Lim <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactuca stiva</i> L.	<i>Parthernocissus henryana</i> (STS)	CaMV35S	<i>t</i> -resvératrol	56,4	Effet sur la morphologie des cellules HeLa	Liu <i>et al.</i> , 2006
<i>Pisum Sativum</i> L.	<i>Vst1</i>	<i>Vst1</i>	2 glucosides de resvératrol	0,53-5,2	-	Richter <i>et al.</i> , 2006
<i>Populus alba</i> L.	<i>StSy</i>	CaMV35S	<i>t</i> - et <i>c</i> -picéide	309-615	Pas de résistance <i>in vitro</i> à <i>Melampsora pulcherrima</i>	Giorcelli <i>et al.</i> , 2004, Seppänen <i>et al.</i> , 2004
<i>Carica papaya</i> L.	<i>Vst1</i>	<i>Vst1</i>	Glucoside de resvératrol	54	Résistance à <i>Phytophthora palmivora</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2004
<i>Brassica napus</i> L.	<i>Vst1</i>	p-nap	Glucoside de resvératrol	361-616	Qualité alimentaire améliorée: concentration en picéide élevée et réduction de la teneur en esters de sinaptate	Hüsken <i>et al.</i> , 2005
<i>Humulus lupulus</i>	<i>Vst1</i>	CaMV35S	<i>t</i> - et <i>c</i> -picéide, <i>t</i> -astringine, <i>t</i> - et <i>c</i> -resvératrol et un stilbène en <i>cis</i> inconnu	490-560	Concentrations plus élevées en flavonoïdes et acides	Schwekendiek <i>et al.</i> , 2007

grâce aux stilbènes. Dans la plupart des cas, l'introduction de gènes codant des stilbènes synthases a mené à la production et à l'accumulation de stilbènes et/ou à l'augmentation de la résistance de la plante aux pathogènes (Delaunoy *et al.*, 2009) (tableau 4). Toutefois, dans certains cas, cette insertion n'a pas eu l'effet attendu.

Ces recherches ont mis en évidence une connaissance encore incomplète des mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des stilbènes et de manière plus générale encore, des phénylpropanoïdes. Par exemple, l'introduction de la stilbène synthase *NS-Vitis3* (*Vitis riparia*) chez la fraise (*Fragaria ananassa*) a modifié le profil phytochimique des feuilles : le resvératrol et ses dérivés n'ont pas été détectés mais cette insertion de gène a donné lieu à une diminution de l'expression des *CHS*, une modification des teneurs en certains polyphénols et à l'apparition de composés non identifiés (Hanhineva *et al.*, 2009).

## 7 Les racines transformées

### 7.1 Origine et mécanisme

Le terme de "racines transformées", aussi appelées "chevelus racinaires" (ou "hairy roots" en anglais) a été utilisé pour la première fois au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Stewart *et al.*, 1900) et repris plus tard par Hildebrandt (1934). Ces racines ont été décrites comme la formation d'une masse de fines racines, à l'origine de leur nom, se produisant directement au site d'infection par *Agrobacterium rhizogenes*. L'organisme responsable de ce phénomène a tout d'abord été nommé *Phytomonas rhizogenes* par Riker *et al.* (1930), qui l'ont ensuite renommé *Agrobacterium rhizogenes*. Des études récentes (Shams *et al.*, 2013) ont montré un lien étroit entre les genres *Agrobacterium* et *Rhizobium*, qui ont mené à sa nouvelle dénomination de *Rhizobium rhizogenes*. Le nom *Agrobacterium* reste toutefois très utilisé dans la littérature.

Les souches virulentes de cette bactérie comportent un plasmide Ri ("Root inducing") d'environ 200 kb (figure 10), comportant une origine de réplication (*ori*), les gènes de virulence (*vir*), des régions permettant l'export et l'intégration de la région T qui va venir s'intégrer dans le génome de la plante (figure 11) (Chilton *et al.*, 1982). La région T comporte deux parties : 1) les gènes *rol* A, B, C et D, qui sont des facteurs de croissance et de différenciation des cellules, 2) les gènes *iaaM* et *iaaH* qui sont responsables de la synthèse

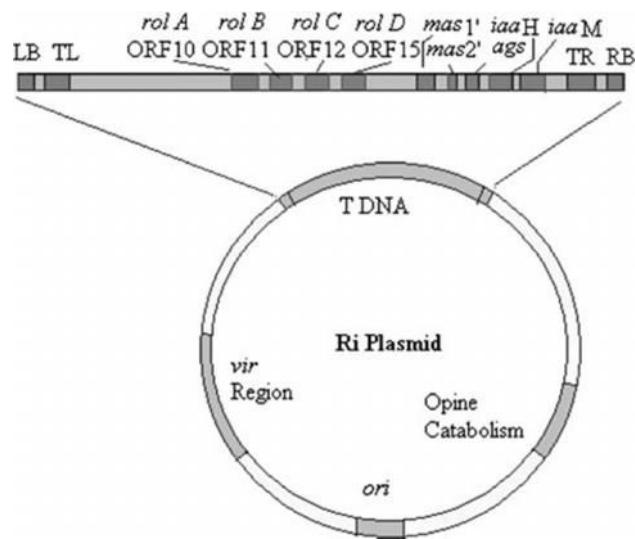


Figure 10 : représentation schématique du plasmide Ri de *R. rhizogenes* (Chandra, 2011).

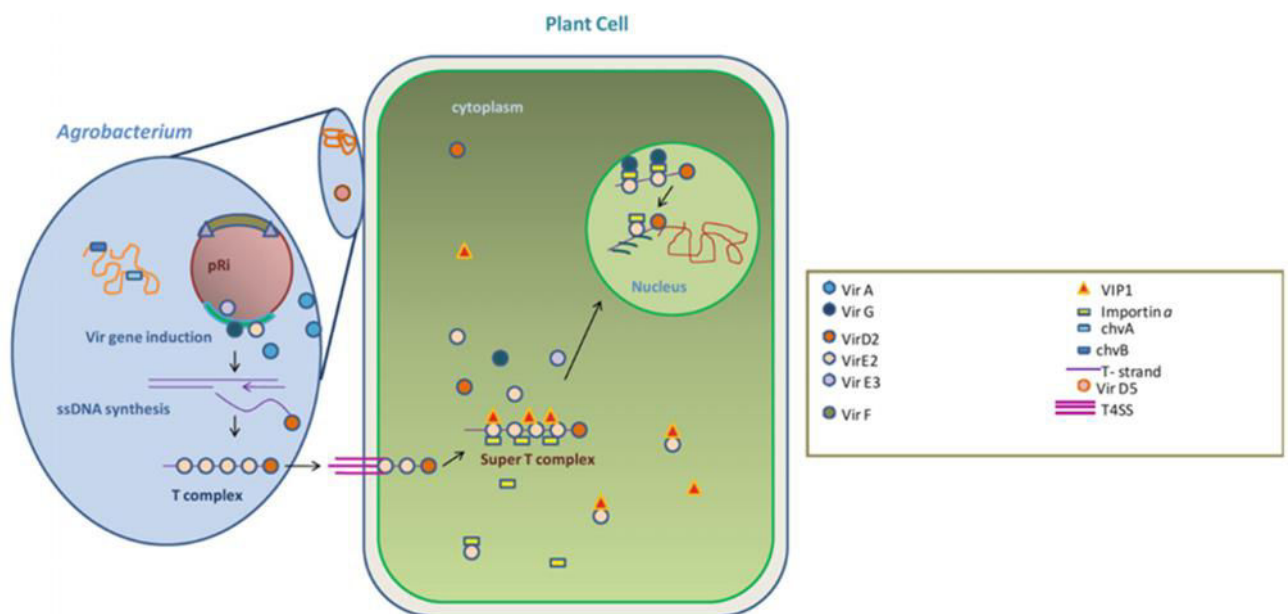


Figure 11 : représentation schématique du transfert de la région T du plasmide Ri de *R. rhizogenes* lors de la transformation d'une cellule de plante (Chandra, 2011).

d'auxines (De Paolis *et al.*, 1985) et qui modifient ainsi la balance hormonale de la plante pour induire la formation de racines et 3) les gènes *mas1*, *mas2* et *ags*, responsables de la synthèse d'opines par la plante, qui seront ensuite utilisées comme source de nutriments par la bactérie (Dessaux *et al.*, 1992).

Les interactions détaillées entre les différents effecteurs de l'agrobactérie et la cellule de la plante infectée sont reprises dans la figure 12 (Gelvin, 2003 ; 2012 ; Tzfira et Citovsky, 2000). Ces illustrations montrent bien que selon l'espèce ou même l'individu de la plante infectée, le taux de génération de racines transformées peut grandement varier avec les taux d'expression des différents gènes impliqués et les concentrations d'hormones endogènes. De la même façon, la souche bactérienne utilisée peut aussi avoir une grande influence sur le taux d'apparition de racines, qui peut varier de 0 à plus de 80 % ainsi que sur le nombre de racines apparaissant et leur croissance (Kim *et al.*, 2010a). Ces paramètres peuvent notamment varier selon le taux d'expression des gènes impliqués et le nombre de copies du plasmide Ri.

## 7.2 Caractéristiques des racines transformées

Les racines transformées ont comme caractéristique d'avoir un fort taux de ramification, une croissance relativement rapide ne nécessitant pas d'apport en hormones exogènes et de ne plus avoir de géotropisme (Cardarelli *et al.*, 1987). Les gènes exprimés dans les racines transformées suivent un profil similaire à celui observé dans des racines naturelles. Toutefois, leurs niveaux d'expression peuvent être modifiés, notamment par les gènes *rol* qui peuvent avoir un effet inducteur sur le métabolisme spécialisé (Bulgakov, 2008) et sur la production de phytoalexines (Dubrovina *et al.*, 2009). Cet effet inducteur est indépendant des voies du méthyl jasmonate, de l'éthylène et de l'acide salicylique (Bulgakov *et al.*, 2002).

L'insertion de la région T du plasmide Ri de la bactérie dans la plante se fait de façon aléatoire et le nombre de copies est variable (Gelvin, 2003). De ce fait, elle peut perturber l'expression de gènes dans la plante et donc altérer le profil biochimique et le phénotype de l'hôte. Chaque racine apparaissant sur la plante infectée provient d'un événement de transformation différent et doit donc être traitée comme une lignée racinaire unique (clone).

Les racines obtenues grâce à des souches sauvages de *R. rhizogenes* ne sont pas considérées comme des OGMs malgré l'intégration des gènes bactériens. En effet, ce processus est un phénomène entièrement naturel et n'implique aucune méthode de génie génétique. Il est toutefois possible, à l'aide de méthodes de génie génétique, d'insérer des

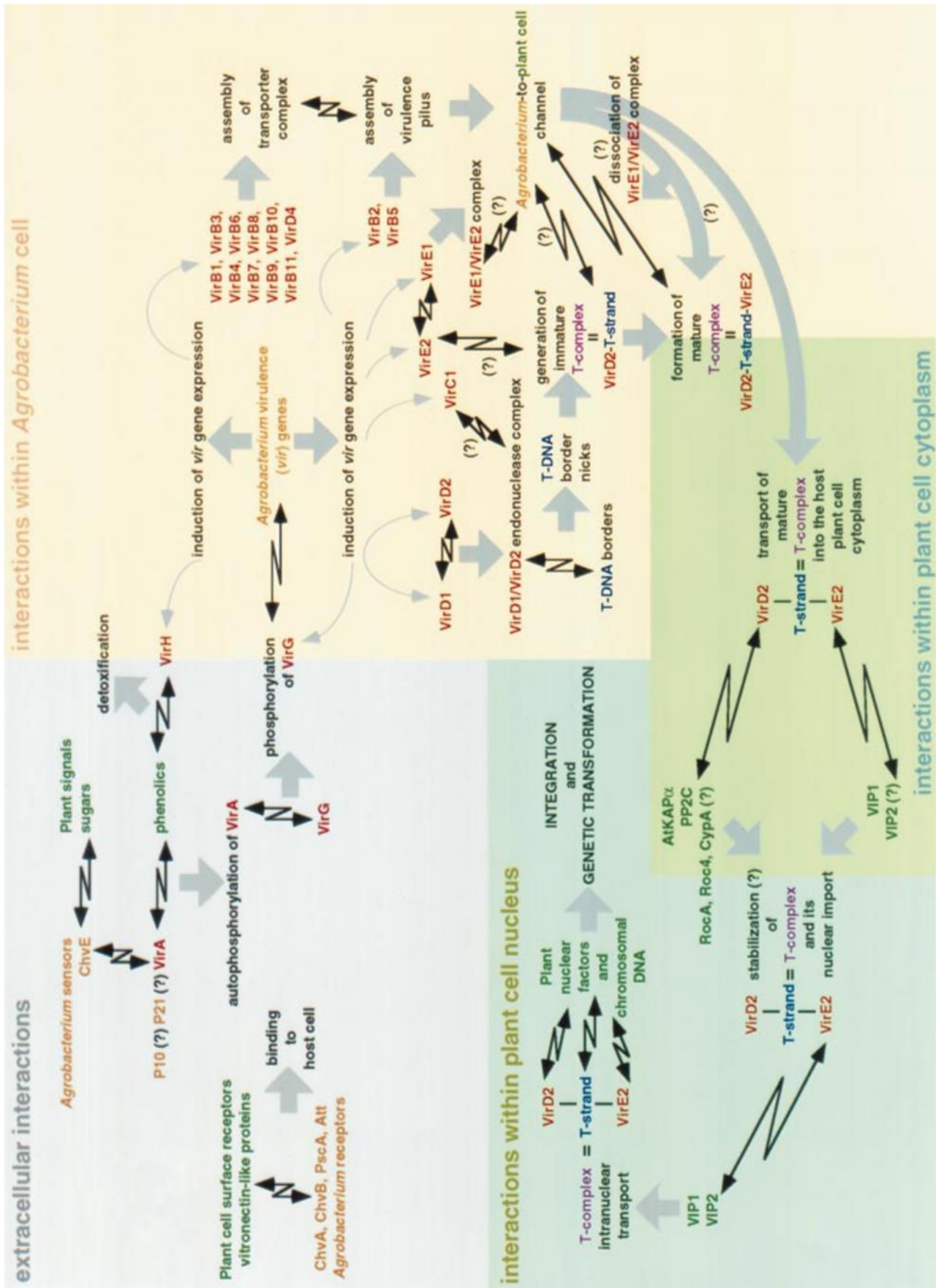


Figure 12 : interactions plante – agrobacterie selon Tzfira et Citovsky (2000).

gènes étrangers dans la région T du plasmide Ri de la bactérie et ainsi de les transmettre à la plante. Des racines obtenues de cette façon sont alors des OGMs. Ces derniers étant encore mal acceptés par le grand public (Lucht, 2015) et afin de préserver au mieux le métabolisme racinaire de nos lignées pour les étudier, nous avons choisi de nous concentrer sur des lignées non transgéniques. Toutefois, l'utilisation de lignées de racines transgéniques en laboratoire ou en milieu confiné est un très bon outil pour l'étude de l'importance d'un gène pour la plante. En effet, les autres techniques de transgénèse telles que la biolistique et l'électroporation sont plus adaptées pour des études d'expression transitoire, ne nécessitant pas la régénération de la plante entière. Un inconvénient de ces dernières par rapport à l'usage des agrobactéries est le fait qu'elles mènent souvent à l'insertion d'un grand nombre de copies d'ADN, pouvant faire apparaître des phénomènes de silencing ou co-suppression (Chandra, 2011). De plus, l'expression à court terme d'enzymes n'est pas idéale pour une production importante de leurs métabolites.

### 7.3 Les principaux axes de recherche sur les racines transformées

Les propriétés des racines transformées ont suscité l'intérêt des chercheurs sur de nombreux aspects. Les axes de recherche développés vont de l'étude de la composition et de la biologie des racines à leur utilisation pour développer des caractères agronomiques particuliers (figure 13). La possibilité de les cryoconserver (Kim *et al.*, 2010b ; Touno *et al.*, 2006 ; Xue *et al.*, 2007) en fait un outil particulièrement intéressant pour des applications tant en recherche qu'en industrie.

#### **L'amélioration des rendements de production en métabolites**

De nombreux métabolites d'intérêt tels que des alcaloïdes, terpènes, et composés phénoliques sont naturellement produits dans les racines transformées de différentes espèces (Ono et Tian, 2011). L'optimisation du milieu de culture est une étape nécessaire à la mise au point d'un système de production rentable. Du fait du nombre de conditions possibles pouvant affecter la croissance et la production, de plus en plus d'études cherchent à mettre au point des approches *in silico* pour optimiser les tests à réaliser et ainsi limiter le nombre d'expérimentations (Mehrotra *et al.*, 2013a).

Un autre axe de recherche porte sur la conduite de cultures en bioréacteurs. En effet, les difficultés d'homogénéité dans le bioréacteur (notamment les gradients de nutriments et d'oxygène dissous) sont de plus en plus marquées avec la montée en échelle des cultures.







Ceci est dû à la formation d'amas de racines et à l'agitation douce utilisée habituellement pour limiter les contraintes mécaniques exercées sur les racines. Les premières cultures de racines transformées en bioréacteurs datent de 1986 (Rhodes *et al.*, 1986). La possibilité de cultiver ces racines en milieu liquide et en gros volumes (10 000 litres) (Georgiev *et al.*, 2012) pour la production de métabolites d'intérêt les rendent particulièrement attractives d'un point de vue industriel. Cette technologie est rapidement apparue comme très prometteuse pour la production de métabolites végétaux (Curtis, 2010) et a donné lieu à la création de l'entreprise ROOTec bioactives Ltd (Suisse), dont les actifs (brevets, savoir faire et clones) ont récemment été rachetés par Green2Chem (Belgique) ; ou avec des racines adventives par CBN Biotech (Corée du sud). Le frein majeur de ces technologies est le coût souvent élevé du matériel par rapport à la productivité des cultures (Mehrotra *et al.*, 2015).

Pour tenter de lever les difficultés rencontrées par ces systèmes de culture, des approches interdisciplinaires telles que la modélisation et les simulations de la croissance sont développées (Mehrotra *et al.*, 2015). Ces outils facilitent le suivi et la maîtrise, entre autres, de la production de biomasse, de la consommation en nutriments et de l'oxygène dissous aux différentes étapes et en différents points dans la culture (Mairet *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2009 ; Palavalli *et al.*, 2012).

Les traitements d'élicitations sont très utilisés pour chercher à comprendre la production de métabolites par des racines transformées (Guillon *et al.*, 2006a ; Georgiev *et al.*, 2007). Ces études se sont ensuite étendues à la réponse des racines à un stress et à des pathogènes (Guillon *et al.*, 2006b ; Goel *et al.*, 2011). Les racines transformées peuvent ainsi être utilisées comme modèle d'étude simplifié du fait de leur comportement biochimique similaire aux racines naturelles (Flores *et al.*, 1987) et le fait qu'elles soient cultivées en conditions maîtrisées. Des études du transcriptome et du métabolome ont par exemple permis d'identifier des gènes impliqués dans la synthèse de ginsénosides et d'autres métabolites en réponse au MeJA chez *Panax ginseng* (Choi *et al.*, 2005 ; Sathiyamoorthy *et al.*, 2010 ; Wang et Wu, 2013). Ce type d'outil permet donc la mise en évidence de gènes impliqués dans les mécanismes de réponse à un stress ou un éliciteur.

Une autre approche utilisée pour étudier les régulations et les flux métaboliques dans les racines transformées est l'ajout de précurseurs dans le milieu de culture. L'utilisation de substrats marqués permet le suivi de leur incorporation dans la voie métabolique (Sriram *et al.*, 2007, Al Balhki *et al.*, 2012) et ainsi d'identifier des intermédiaires réactionnels ou des étapes limitantes dans la voie de biosynthèse. En combinaison avec des traitements



d'élicitation, l'ajout de précurseur peut donner lieu à des niveaux de production de métabolites secondaires prometteurs (Shinde *et al.*, 2009 ; Verma *et al.*, 2014).

L'ingénierie métabolique est très utilisée pour orienter ou modifier le métabolisme vers une meilleure production ou intégrer une nouvelle voie dans un autre organisme. Cette approche nécessite une très bonne connaissance du métabolisme pour un effet optimal. Toutefois, elle constitue un bon outil d'étude pour caractériser l'action de différentes enzymes ou acteurs du métabolisme (enzymes et régulateurs) et du catabolisme du métabolite étudié (Peebles *et al.*, 2009 ; Chandra et Chandra, 2011). Dans les racines transformées, les approches testées actuellement consistent principalement en la surexpression d'un ou plusieurs gènes pour l'accumulation d'un métabolite (Mehrotra *et al.*, 2010, 2013a ; Zhou *et al.*, 2011), en compensant les étapes limitantes et/ou en diminuer la perte des substrats vers les autres voies.

### **Autres applications**

Les racines transformées permettent aussi l'étude des interactions des racines avec des changements de leur environnement tels que la température, la salinité ou avec des microorganismes. Toutefois ces aspects sont actuellement moins développés que les recherches portant sur la production de métabolites d'intérêt (Mehrotra *et al.*., 2015).

La biotransformation de molécules par des cultures de racines peut permettre la synthèse de nouveaux composés en utilisant leurs enzymes endogènes. Ces transformations peuvent par exemple être des glycosylations, réductions, oxydations, condensations, hydrolyses, isomérisation, etc. (Banerjee *et al.*, 2012). Certaines plantes, telles que *Pharbitis nil*, *Brassica napus* et *Atropa belladonna* sont capables de réaliser plusieurs types de transformations simultanément (Banerjee *et al.*, 2012 ; Srivastava *et al.*, 2012 ; 2013).

Des études portent aussi sur la biorémédiation utilisant des racines transformées avec les enzymes endogènes pour la dégradation de molécules organiques tels que des composés phénoliques ou des colorants par des peroxydases ou des laccases, notamment chez les plantes du genre *Daucus*, *Lycopersicon*, *Tagetes* et *Brassica* (Zhou *et al.* 2013). Des essais ont aussi été réalisés à l'échelle pilote avec des racines de tabac transgéniques exprimant des peroxydases (Sosa alderete *et al.*, 2012). Pour les contaminants de type métaux lourds, l'utilisation d'espèces hyper-accumulatrices permet de les piéger dans les racines, par exemple pour le cadmium chez *Thlaspi caerulescens* et *Hyptis capitata* ou le nickel chez *Alyssum bertolonii* (Boominathan et Doran, 2003a, 2003b ; Nedelkoska et Doran, 2000).



Une autre utilisation importante des racines transformées est l'expression de protéines recombinantes, le plus souvent à visée thérapeutique, comme par exemple les anticorps, cytokines, vaccins ou autres protéines nécessitant des modifications post-traductionnelles complexes telles que des glycosylations, acétylations ou phosphorylations (Wongsamuth et Doran, 1997 ; Obembe *et al.*, 2011 ; Georgiev *et al.*, 2012). Ces modifications ne sont pas réalisables avec des systèmes de production procaryotes et jouent un rôle dans l'activité et la stabilité des protéines (Gomord et Faye, 2004). De plus, ces cultures se font en conditions maîtrisées, assurant une qualité constante au cours de l'année et l'absence de contaminants (Huet *et al.*, 2014). Cette technologie est notamment développée et utilisée par la compagnie Root Lines Technology (France).

Les plantes régénérées à partir de racines transformées (transgéniques ou non) peuvent parfois présenter des propriétés différentes des plantes normales, notamment au niveau du phénotype, du fait de l'insertion de la région T du plasmide bactérien Ri (Christey et Braun, 2005 ; Makhzoum *et al.*, 2013 ; Mehrotra *et al.*, 2013b). Ces plantes peuvent être sélectionnées pour favoriser des caractéristiques d'intérêt agronomique telles que des traits physiologiques, la tolérance à différents stress, ou l'accumulation de certains composés. L'insertion d'un gène d'intérêt dans cette région du plasmide avant infection de la plante suivie de la régénération de la plante entière permet l'obtention de plants transgéniques (OGMs).

#### 7.4 Les racines transformées de vigne

Les premières utilisations de racines transformées de vigne pour des études en laboratoire remontent à 1997, avec la génération de racines exprimant des protéines virales, visant à augmenter la résistance au virus de la mosaïque jaune-chrome de la vigne (Torregrosa et Bouquet, 1997). Leurs racines ont été générées par écrasement de la partie supérieure de la tige de vitroplants avec une pince infectée avec *R. rhizogenes* ATCC 15834. Plus tard, cet outil a été utilisé pour étudier le rôle de 3 transgènes de *Sorghum bicolor*, *CYP79A1*, *CYP71E1* et *HMNGT*, sur le métabolisme spécialisé de la vigne (Franks *et al.*, 2006), puis pour des expériences de RNA silencing pour limiter l'infection par les nématodes à galle dans les racines de vigne, utilisant la souche bactérienne *R. rhizogenes* A4 (Yang *et al.*, 2013a).

Ce n'est que très récemment que sont parues les premières études du métabolisme des stilbènes dans des racines transformées de muscadine (*Vitis rotundifolia* L.), obtenues par incision des explants foliaires avec un scalpel infecté avec *R. rhizogenes* ATCC 15834,



(Nopo-Olazabal *et al.*, 2013) et de leur réponse à des éliciteurs. La cinétique d'apparition des stilbènes dans ces racines après traitement au méthyl jasmonate et au peroxyde d'hydrogène a montré une réponse similaire dans les deux cas, avec une augmentation de la production de *t*-resvératrol excrété dans le milieu de culture et de picéide, *t*-resvératrol et -viniférine dans les racines (Nopo-Olazabal *et al.*, 2014).

## 8 Localisation des différents stilbènes

La localisation des métabolites spécialisés chez les plantes est un paramètre capital *in planta* afin que ceux-ci puissent jouer leur rôle dans la défense mais elle est aussi importante en termes de bioproduction, pour comprendre et optimiser les mécanismes d'excrétion des molécules d'intérêt. La capacité de la vigne à résister à une attaque de pathogène dépend de sa capacité à produire des stilbènes (Pool *et al.*, 1981) mais aussi de sa capacité à induire leur synthèse ou leur accumulation au niveau du site d'infection (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011 ; Bellow *et al.*, 2012).

L'étude de la localisation des stilbènes est facilitée par leur autofluorescence, qui permet leur observation directe sous lumière UV. Bien que la lignine soit aussi capable d'émettre dans les mêmes longueurs d'ondes quand elle est exposée à des rayonnements UV, l'étude de la fluorescence a été décrite comme un moyen rapide de localiser les stilbènes chez la vigne (Bellow *et al.*, 2012 ; Houillé *et al.*, 2015 ; Poutaraud *et al.*, 2007). L'analyse des pics d'émission de fluorescence fournit aussi une indication sur la nature des stilbènes présents dans les échantillons, qui peut ensuite être confirmé par HPLC (Houillé *et al.*, 2015). Il est toutefois important de noter que la fluorescence des stilbènes est dépendante de la viscosité et du pH de leur environnement. Le pH n'a probablement qu'une faible incidence *in vivo* car il est habituellement compris entre 7,5 dans le cytosol et 5,5 dans la vacuole (Bligny *et al.*, 1997) et 6,5 environ dans l'apoplasme au niveau des stomates (Felle et Hanstein, 2002). Dans cet intervalle de pH seule la forme entièrement protonnée des stilbènes est présente, donc leur fluorescence ne devrait pas varier. Par contre la viscosité peut varier énormément entre les différents types cellulaires, notamment entre les vacuoles, le cytoplasme et les parois cellulaires et la cuticule. Les rendements de fluorescence varient probablement d'un facteur de plus de 140 entre ces différents compartiments (Bellow *et al.*, 2012), ce qui explique en partie la forte fluorescence observée au niveau des cellules de garde.





L'imagerie par spectrométrie de masse permet aussi d'obtenir des informations sur la localisation et la nature des stilbènes dans un échantillon. Malheureusement cette méthode ne permet pas encore de le faire *in vivo*, présente encore une résolution limitée et ne permet que l'analyse de la surface de l'échantillon (Hamm *et al.*, 2010).

## 8.1 Au niveau de la plante

L'accumulation de stilbènes est spécifique de certains tissus mais elle est aussi dépendante de l'espèce étudiée. Il a par exemple été montré que chez l'arachide, le *t*-resvératrol est principalement accumulé au niveau des gousses, des racines et des feuilles (Chung *et al.*, 2003), alors que, chez la vigne, il serait plutôt accumulé au niveau des phloèmes des tiges, des bourgeons axillaires et des racines (Wang *et al.*, 2010). De la même façon, la STS est significativement exprimée dans la pulpe des baies de *V. labrusca* (Hall et De Luca, 2007), alors qu'elle est principalement transcrite (Adrian *et al.*, 2000 ; Ali et Strommer, 2003 ; Jeandet *et al.*, 1991 ; Versari *et al.*, 2001) et traduite (Fornara *et al.*, 2008) au niveau de la peau et très peu au niveau de la pulpe des baies de *V. vinifera* L. Chez la vigne, la STS a aussi été montrée comme présente dans de nombreux organes tels que les feuilles, racines, bourgeons, vrilles et tiges (Wang *et al.*, 2010). Sa localisation au niveau de ces organes a été associée à son rôle dans la synthèse de composés de défense, afin qu'elle se fasse proche de leur lieu d'action (Fornara *et al.*, 2008).

De façon plus précise, les sarments montrent une accumulation importante de stilbènes, sous forme monomérique principalement, au niveau des tissus conducteurs (Houillé *et al.*, 2015). Le cortex et la moelle du sarment contiennent quant à eux majoritairement des formes oligomériques de stilbènes. L'autofluorescence des stilbènes a permis de montrer leur présence proche des zones nécrotiques autour des cellules de garde infectées (Dai, 1995a et b), ainsi qu'au niveau des cotés abaxiaux et adaxiaux des parois cellulaires et des vaisseaux conducteurs (Bellow *et al.*, 2012 ; Poutaraud *et al.*, 2007). Il a aussi été montré que les feuilles de vigne étaient capables de sécréter directement du *t*-resvératrol après exposition à des inducteurs tels que des UVs ou des polysaccharides (Blaich et Bachmann, 1980).

Il est intéressant de noter l'hétérogénéité de la répartition du resvératrol, des ARNm de la STS et de la STS dans la plante (figure 14). On remarque en effet une concentration en *t*-resvératrol (figure 14A) importante (16 mg/kg MF) dans le phloème de la tige mais aussi au niveau des bourgeons axillaires (9 mg/kg MF). On le retrouve aussi de manière constitutive

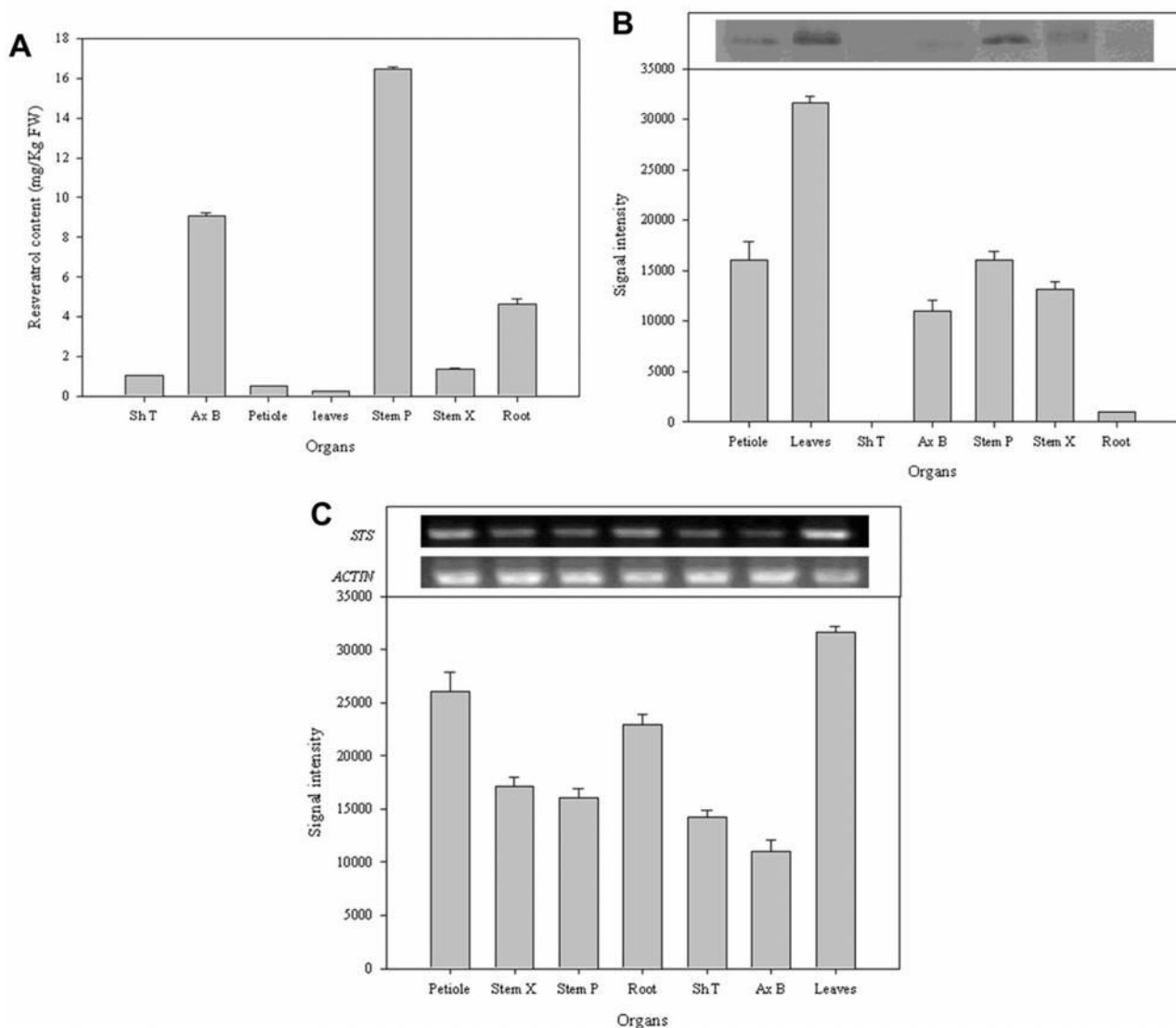


Figure 14 : Distribution du *t*-resvératrol (A), de la STS (B) et de ses transcrits (C) dans les différents organes de la vigne. Les compartiments analysés sont la pointe de tige (Sh T), bourgeon axillaire (Ax B), pétiole, feuille, phloème de la tige (Stem P), xylème de la tige (Stem X) et la racine. **A** : Dosage du *t*-resvératrol, **B** : Analyse par Western blot de la STS dans les différents organes de la plante. 20mg de protéines ont été chargés. Les feuilles de 10 plantes ont été rassemblées pour chaque extraction de protéines pour avoir un profil protéique moyen. Les protéines ont été détectées avec du sérum immun dirigé contre la STS (dilué au 1:1000). Trois répliquats indépendants ont été réalisés. **C** : Analyse par RT-PCR de la localisation des ARNm de la STS dans les différents organes. L'amplification de l'ADNc de l'Actine1 a été utilisée comme contrôle pour standardiser l'expression. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type et les résultats des bandes sur nitrocellulose sont issus d'une des expériences. D'après Wang *et al.* (2010).

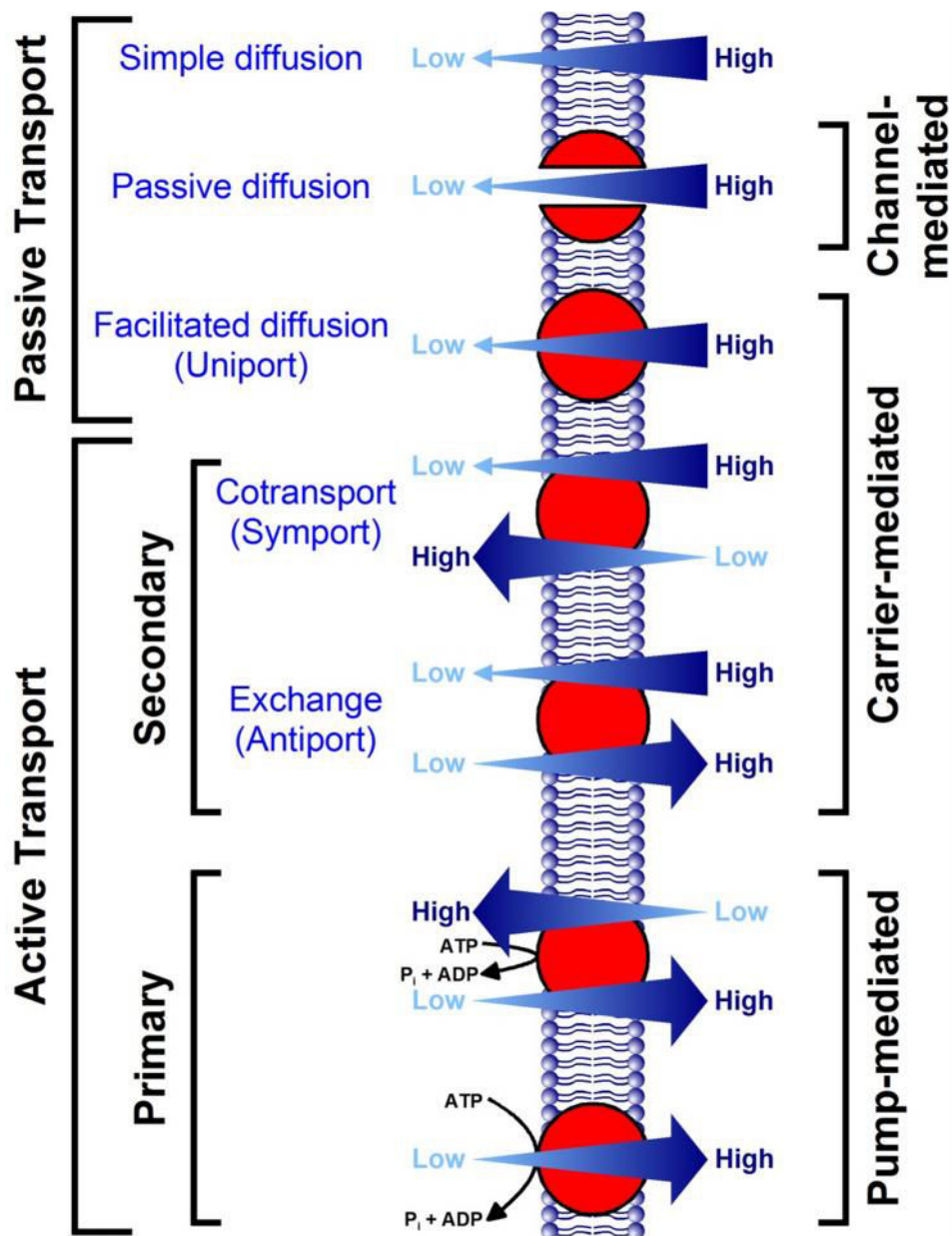
dans les racines (4 mg/kg MF), mais beaucoup moins dans les autres organes. Les ARNm de la STS sont quant à eux présents dans tous les organes et plus particulièrement dans les feuilles, pétioles et racines (figure 14C). Ceci laisse supposer une régulation au niveau transcriptionnel, traductionnel et/ou d'un transport actif des stilbènes dans la plante.

## 8.2 Au niveau tissulaire et cellulaire

La localisation des stilbènes au niveau subcellulaire dépend du lieu de leur biosynthèse, de la formation de dérivés et de leur transport ou stockage dans la cellule. Les stilbènes à l'intérieur des tissus de la feuille sont difficiles à détecter par des méthodes de microscopie à fluorescence (Poutaraud *et al.*, 2010), ce qui explique la difficulté à corrélérer les résultats obtenus avec cette méthode à ceux obtenus par HPLC et au niveau de résistance de la plante (Bellow *et al.*, 2012). Toutefois, Bellow *et al.* (2012) ont pu observer l'autofluorescence des stilbènes dans les vacuoles des cellules épidermiques et du mésophylle lacuneux par microscopie confocale, montrant ainsi leur présence à l'intérieur des tissus de la feuille. Ceci est en accord avec les observations précédentes ayant montré une fluorescence liée aux stilbènes dans des protoplastes de feuilles de vigne exposées à des UV (Commun *et al.*, 2003). Cette méthode ne leur a pas permis d'identifier les stilbènes détectés.

Des observations réalisées sur cultures de cellules en suspension ont permis de visualiser une accumulation de fluorescence au niveau de la membrane plasmique ou de la paroi, formant des amas en périphérie de la cellule suite à un traitement au MeJA (Donnez, 2010, Chastang, 2014). Ces mesures ne permettent toutefois pas de localiser précisément les stilbènes par rapport à la membrane plasmique, d'éventuelles vésicules ou à la paroi cellulaire. Dans ces cultures, on observe une accumulation de picéide suite à l'élicitation (Donnez *et al.*, 2011) et une excrétion du *t*-resvératrol dans le milieu de culture (Donnez *et al.*, 2009). L'accumulation de picéide se fait probablement dans la vacuole, en tant que forme de stockage de *t*-resvératrol, moins active mais mieux soluble en solution aqueuse (Park *et al.*, 2012). L'excrétion de stilbènes et leur association à la paroi cellulaire dans les cellules en suspension de pin et de vigne ont été montrées comme contribuant au renforcement des défenses suite à une exposition à un champignon inactivé (*Lophodermium seeditiosum*) (Lange *et al.*, 1994) ou aux UV respectivement (Lesniewska *et al.*, 2004).

La localisation subcellulaire des viniférines est probablement liée à leur biosynthèse, qui utilise des peroxydases localisées dans la vacuole, dans la paroi cellulaire ou sécrétées



© PhysiologyWeb at www.physiologyweb.com

Figure 15 : principaux types de transports transmembranaires (source : physiologyweb.com, 2016)

dans le milieu extracellulaire (Ros Barcelo *et al.* 2003 ; Jeandet *et al.*, 2002 ; Morales *et al.*, 1997). Grâce à des études d'immunolocalisation, la STS a été détectée dans la paroi cellulaire (Fornara *et al.*, 2008 ; Qiu-Hong Pan, 2009), le chloroplaste, le reticulum endoplasmique (Qiu-Hong Pan, 2009) et la peau de la baie de raisin (Fornara *et al.*, 2008). Elle a aussi été détectée dans le cytoplasme, le chloroplaste, la vacuole et le noyau (Wang *et al.*, 2010). Finalement, la STS a aussi été montrée comme potentiellement présente dans des vésicules, au niveau de la membrane plasmique et au niveau de la paroi, ce qui indique son excrétion dans l'apoplasme (Fornara *et al.*, 2008). L'absence de peptide signal pour la sécrétion suppose l'utilisation d'un autre moyen de sécrétion (Fornara *et al.*, 2008). Toutefois, une synthèse extracellulaire du *t*-resvératrol nécessiterait la présence de transporteurs de ses substrats, le coumaroyl-CoA et le malonyl-CoA vers l'extérieur de la cellule.

## 9 Transport de métabolites secondaires et stilbènes dans la plante

Comme évoqué précédemment, la localisation des molécules de défense chez la plante est primordiale afin qu'elles puissent jouer leur rôle. Le transport est donc un paramètre essentiel pour acheminer ces molécules sur leurs lieux d'action et préserver la plante des éventuels effets toxiques de ses propres métabolites.

Les transports de molécules peuvent être classés en deux catégories : le transport passif et le transport actif (figure 15). Le transport passif a lieu grâce à des phénomènes de diffusion simple ou de diffusion facilitée (canaux transmembranaires). Ce transport se fait toujours dans le sens du gradient. Le transport actif quant à lui peut se faire dans les deux sens, utilisant une source d'énergie telle que l'ATP (Lodish *et al.*, 2000). L'autre possibilité est d'utiliser un gradient de concentration d'un autre composé tel que des ions, on parle alors de symport ou d'antiport lorsque les gradients sont dans le même sens ou opposés respectivement. D'autres formes de transport actif vont utiliser des vésicules pour déplacer des molécules d'un compartiment à l'autre de la cellule ou permettre des échanges avec l'extérieur (Satiat-Jeunemaitre et Hawes, 1993). Dans le cas des molécules du métabolisme spécialisé (tableau 5), on retrouve le plus souvent des transports actifs utilisant des ABC (ATP Binding Cassette) transporteurs (Kang *et al.*, 2011 ; Verrier *et al.*, 2008 ; Yazaki *et al.*, 2009 ; Shoji, 2014) ou des MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion), qui utilisent un gradient de protons ou des transports vésiculaires (Petrucci *et al.*, 2013 ; Yazaki, 2005 ; Nour-Eldin et Halkier, 2013 ; Shoji, 2014 ; Takanashi *et al.*, 2014 ). On retrouve aussi des transporteurs de type NRT

Tableau 5 : transporteurs impliqués dans le déplacement de métabolites spécialisés chez les plantes (d'après Shitan, 2016).

Transporteur	Espèce	Famille	Fonctions physiologiques proposées	Références
<b>Alcaloïdes</b>				
CjABCB1/ CjAMDR1	<i>Coptis japonica</i>	ABCB	Influx de berbérine dans le rhizome	Yazaki <i>et al.</i> , 2006 ; Shitan <i>et al.</i> , 2003 ; Shitan <i>et al.</i> , 2013 ; Shitan <i>et al.</i> , 2005
CjABCB2	<i>Coptis japonica</i>	ABCB	Influx de berbérine dans le rhizome	Shitan <i>et al.</i> , 2013
Cj ABCB3	<i>Coptis japonica</i>	ABCB	Influx de berbérine dans des cultures de cellules	Shitan <i>et al.</i> , 2013
CrTPT2	<i>Catharanthus roseus</i>	ABCG	Efflux de catharanthine à la surface de la feuille	Yu et De Luca, 2013
Nt-JAT1	<i>Nicotiana tabacum</i>	MATE	Transport de nicotine vers la vacuole des cellules foliaires	Morita <i>et al.</i> , 2009 ; Shitan <i>et al.</i> , 2009 ; Shitan <i>et al.</i> , 2015
Nt-JAT2	<i>Nicotiana tabacum</i>	MATE	Transport de nicotine vers la vacuole des cellules foliaires	Shitan <i>et al.</i> , 2014 ; Shitan <i>et al.</i> , 2015
NtMATE1	<i>Nicotiana tabacum</i>	MATE	Transport de nicotine vers la vacuole des cellules racinaires	Shoji <i>et al.</i> , 2009
NtMATE2	<i>Nicotiana tabacum</i>	MATE	Transport de nicotine vers la vacuole des cellules racinaires	Shoji <i>et al.</i> , 2009
NtNUP1	<i>Nicotiana tabacum</i>	PUP	Influx de nicotine dans les cellules racinaires, régulation du métabolisme de la nicotine	Hildreth <i>et al.</i> , 2011 ; Zhao <i>et al.</i> , 2013a, b ; Kato <i>et al.</i> , 2014 ; 2015
<b>Composés phénoliques</b>				
AtABCG29	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Transport de monolignols vers la paroi cellulaire	Alejandro <i>et al.</i> , 2012
AtABCG37	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Efflux de scopolétine vers le sol (putatif)	Fourcroy <i>et al.</i> , 2014
AtFFT	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MATE	Transport de flavonoides (putatif)	Thompson <i>et al.</i> , 2009 ; Thompson <i>et al.</i> , 2010 ; Kitamura <i>et al.</i> , 2016
AtTT12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MATE	Transport de proanthocyanidine (épicatéchine 3'-O-glucoside) vers la vacuole	Debeaujon <i>et al.</i> , 2001 ; Marienova <i>et al.</i> , 2007 ; Zhao et Dixon, 2009
MdMATE1	<i>Malus x domestica</i> Borkh	MATE	Transport de proanthocyanidine vers la vacuole (putatif)	Frank <i>et al.</i> , 2011
MdMATE2	<i>Malus x domestica</i> Borkh	MATE	Transport de proanthocyanidine vers la vacuole (putatif)	Frank <i>et al.</i> , 2011
MtABCG10	<i>Medicago truncatula</i>	ABCG	Modulation de la concentration racinaire en isoflavonoides	Banasiak <i>et al.</i> , 2013
MtMATE1	<i>Medicago truncatula</i>	MATE	Transport de proanthocyanidine (épicatéchine 3'-O-glucoside) vers la vacuole	Zhao et Dixon, 2009
MtMATE2	<i>Medicago truncatula</i>	MATE	Transport de glucosides de flavonoides malonylés vers la vacuole	Zhao <i>et al.</i> , 2011
SIMTP77	<i>Solanum lycopersicum</i>	MATE	Transport de flavonoides (putatif)	Mathews <i>et al.</i> , 2003
VvABCC1	<i>Vitis vinifera</i>	ABCC	Transport d'anthocyanes avec un	Francisco <i>et al.</i> , 2013

			glutathion vers les vacuoles des cellules de l'exocarpe	
VvAM1	<i>Vitis vinifera</i>	MATE	Transport d'anthocyanes acylées en vésicules	Giomez <i>et al.</i> , 2009 ; Gomez <i>et al.</i> , 2011
VvAM3	<i>Vitis vinifera</i>	MATE	Transport d'anthocyanes acylées en vésicules	Giomez <i>et al.</i> , 2009 ; Gomez <i>et al.</i> , 2011
VvMATE1	<i>Vitis vinifera</i>	MATE	Transport de proanthocyanidines vers la vacuole (putatif)	Pérez-Diaz <i>et al.</i> , 2014
VvMATE2	<i>Vitis vinifera</i>	MATE	Transport de proanthocyanidines vers le golgi (putatif)	Pérez-Diaz <i>et al.</i> , 2014
ZmMRP3	<i>Zea mays</i>	ABCC	Transport d'anthocyanes vers la vacuole (putatif)	Goodman <i>et al.</i> , 2014
<b>Glucosinolates</b>				
AtGTR1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NRT	Transport de jasmonoyl-isoleucine et gibbérellines allocation et translocation de glucosinolate	Nour-Eldin <i>et al.</i> , 2012 ; Anderson <i>et al.</i> , 2013 ; Anderson et Halkier, 2014 ; Madsen <i>et al.</i> , 2014 ; Saito <i>et al.</i> , 2015
AtGTR2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NRT	Allocation et translocation de glucosinolate	Nour-Eldin <i>et al.</i> , 2012 ; Anderson <i>et al.</i> , 2013 ; Anderson et Halkier, 2014 ; Madsen <i>et al.</i> , 2014 ; Saito <i>et al.</i> , 2015
<b>Terpénoïdes</b>				
AtABCG40/ AtPDR12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Tolérance au sclaréol, résistance au plomb, transport de l'ABA	Campbell <i>et al.</i> , 2003 ; Lee <i>et al.</i> , 2005 ; Kang <i>et al.</i> , 2010
NpPDR1/ NpABC1	<i>Nicotiana glauca</i>	ABCG	Efflux de sclaréol à la surface de la feuille, mécanisme de défense contre les pathogènes fongiques	Jasinski <i>et al.</i> , 2001 ; Stukkens <i>et al.</i> , 2005 ; Bultrys <i>et al.</i> , 2009
NtPDR1	<i>Nicotiana glauca</i>	ABCG	Efflux de diterpènes au niveau de la membrane plasmique des racines latérales et des trichomes glandulaires	Sasabe <i>et al.</i> , 2002 ; Schenke <i>et al.</i> , 2003 ; Crouzet <i>et al.</i> , 2013
SpTUR2	<i>Spirodela polyrrhiza</i>	ABCG	Transporteur de sclaréol (putatif)	van de Brule <i>et al.</i> , 2002
<b>Cire, cuticule et subérine</b>				
AtABCG1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Synthèse de paroi du pollen	Yadav <i>et al.</i> , 2014
AtABCG2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Formation de la barrière de subérine dans la racine et la graine	Yadav <i>et al.</i> , 2014
AtABCG6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Formation de la barrière de subérine dans la racine et la graine	Yadav <i>et al.</i> , 2014
AtABCG9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Transport de stérylglucosides à la surface du pollen, développement vasculaire des coylédons et de la hampe florale	Le Hir <i>et al.</i> , 2013 ; Choi <i>et al.</i> , 2014
AtABCG11/ COF1/DSO/ WBC11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Export de monomères de cutine (putatif), métabolisme de la subérine dans les racines, développement vasculaire des coylédons et de la hampe florale	Bird <i>et al.</i> , 2007 ; Luo <i>et al.</i> , 2007 ; Panikashvili <i>et al.</i> , 2007 ; Ukitsu <i>et al.</i> , 2007 ; Panikashvili <i>et al.</i> , 2010 ; McFarlane <i>et al.</i> , 2010 ; Le Hir <i>et al.</i> , 2013
AtABCG12/ CER5/WBC12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Formation de cire dans les cellules épidermales de la tige	Pighin <i>et al.</i> , 2004 ; McFarlane <i>et al.</i> , 2010

AtABCG13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Formation de cutine dans les pétales et carpels	Panikashvili <i>et al.</i> , 2011
AtABCG14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Développement vasculaire des coylédons et de la hampe florale	Le Hir <i>et al.</i> , 2013
AtABCG16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Synthèse de paroi du pollen	Yadav <i>et al.</i> , 2014
AtABCG20	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Formation de la barrière de subérine dans la racine et la graine	Yadav <i>et al.</i> , 2014
AtABCG26/ WBC27	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Transport de sporopollenine	Xu <i>et al.</i> , 2010 ; Choi <i>et al.</i> , 2011 ; Dou <i>et al.</i> , 2011 ; Quilichini <i>et al.</i> , 2014
AtABCG31	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Transport de stérylglycosides à la surface du pollen	Choi <i>et al.</i> , 2014
AtABCG32/ PEC1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCG	Formation de la cuticule dans les fleurs et feuilles en développement	Bessire <i>et al.</i> , 2011 ; Fabre <i>et al.</i> , 2016
GL13	<i>Zea mays</i>	ABCG	Formation de cire épicuticulaire dans les feuilles des plantules	Li <i>et al.</i> , 2013
HvABCG31/ EIBI1	<i>Oryza sativa</i>	ABCG	Formation de la cutine et rétention de l'eau dans les feuilles	Chen <i>et al.</i> , 2011 ; Chen <i>et al.</i> , 2011 ; Ma <i>et al.</i> , 2012 ; Yang <i>et al.</i> , 2013b
OsABCG5/ RCN1	<i>Oryza sativa</i>	ABCG	Formation de la barrière de subérine dans les racines	Shiono <i>et al.</i> , 2014
OsABCG15/ PDA1	<i>Oryza sativa</i>	ABCG	Développement de la cuticule de l'anthère, formation d'écine	Niu <i>et al.</i> , 2013 ; Qin <i>et al.</i> , 2013 ; Zhu <i>et al.</i> , 2013 ; Wu <i>et al.</i> , 2014 ; Zhao <i>et al.</i> , 2015
OsABCG26	<i>Oryza sativa</i>	ABCG	Développement de la cuticule de l'anthère, formation d'écine	Zhao <i>et al.</i> , 2015
OsABCG31	<i>Oryza sativa</i>	ABCG	Formation de la cutine et rétention de l'eau dans les feuilles	Chen <i>et al.</i> , 2011
Pp-ABCG7	<i>Physcomitrella patens</i>	ABCG	Formation de cire cuticulaire et tolérance au dessèchement	Buda <i>et al.</i> , 2013
StABCG1	<i>Solanum tuberosum</i>	ABCG	Formation de subérine dans le tubercule	Landgraf <i>et al.</i> , 2014
WBC11	<i>Sorghum bicolor</i>	ABCG	Formation de cire épicuticulaire	Mizuno <i>et al.</i> , 2013



(nitrate-peptide transporter) (Nour-Eldin *et al.*, 2012 ; Nour-Eldin et Halkier, 2013) et PUP (purine perméase) (Jelesko, 2012) dans une moindre mesure (Shitan, 2016). Ces familles représentent un très grand nombre de transporteurs, parmi lesquels beaucoup ne sont pas encore caractérisés et pourraient être impliqués dans les mécanismes de défense (Baetz et Martinoia, 2014) aussi bien que dans le métabolisme primaire (Shitan, 2016). *Arabidopsis thaliana* compte par exemple 120 gènes codant pour des transporteurs ABC, 56 pour des MATE, 53 pour des NRT et 21 pour des PUP (Shitan, 2016).

De nombreux indices suggèrent la présence d'un ou plusieurs transporteurs actifs impliqués dans les déplacements du *t*-resvératrol par les vaisseaux conducteurs, vers les tissus interstitiels ou vers l'extérieur. En effet, bien qu'aucun transporteur n'ait encore été identifié, des mesures indirectes suggèrent fortement un déplacement de *t*-resvératrol : les fortes concentrations de stilbènes observées au niveau des vaisseaux conducteurs (Houillé *et al.*, 2015a ; Wang *et al.*, 2010), la capacité des feuilles de vigne soumises à un traitement UV à excréter du *t*-resvératrol (Blaich et Bachmann, 1980), le fait que les cellules de vigne en suspension (Jeandet *et al.* 2016) ainsi que les racines transformées d'arachide (Medina-Bolivar *et al.*, 2007) et de muscadine (Nopo-Olazabal *et al.*, 2013) soient aussi capables d'excréter des stilbènes dans leur milieu de culture.

Jusqu'à maintenant aucun transporteur MATE n'a été montré comme responsable de l'excrétion de composés antimicrobiens dans la rhizosphère (Baetz et Martinoia, 2014), contrairement aux transporteurs ABC (Strukkens *et al.*, 2005 ; Bienert *et al.*, 2012 ; Meyer *et al.*, 2010). Un transporteur candidat a été mis en évidence par des études de protéome de cellules de Gamay en suspension traitées avec du MeJA et des cyclodextrines (Martinez-Esteso *et al.*, 2009 ; 2011), montrant la surexpression d'une Glutathion S-Transférase (GST) qui pourrait être impliquée dans le transport vacuolaire du *t*-resvératrol. Bien que la liaison d'un glutathion au resvératrol et sa prise en charge par un transporteur n'aient toutefois pas encore été confirmés, il est possible la prise en charge du resvératrol se fasse sans glutathionation. En effet, une GST d'*Arabidopsis thaliana* a été montrée comme responsable du transport d'anthocyanes non glutathionées du cytosol à la vacuole (Sun *et al.*, 2012).



## Objectifs de la thèse

---

Les objectifs de cette thèse sont donc la mise au point d'un nouvel outil, qui permet l'étude de la voie de biosynthèse des stilbènes dans les racines de vigne, encore mal connue au-delà du *t*-resvératrol. Ce travail porte tant sur des questions de culture *in vitro*, que de métabolisme de production des stilbènes, leur localisation, leur induction ainsi que leur régulation.

Nous allons donc vérifier la capacité de la vigne *Vitis vinifera* à générer des racines transformées à partir de souches sauvages de *Rhizobium rhizogenes* et établir un protocole permettant de le faire. Ces cultures seront ensuite stabilisées dans des conditions de cultures adaptées et seront étudiées pour définir les caractéristiques de ce système. Leur aptitude à produire des stilbènes ou non, ainsi que leur capacité à répondre à différents traitements d'élicitation seront évaluées. Des inductions au MeJA en présence de CDs, ayant montré des résultats particulièrement prometteurs sur des cellules de vigne en suspension (Jeandet *et al.*, 2016), seront évalués dans un premier temps. Cette base permettrait ensuite de réaliser une étude plus approfondie de la bioproduction des stilbènes dans les racines. Pour ce faire, une caractérisation complète du profil phytochimique constitue une base idéale pour étudier les cinétiques d'apparition et de disparition des différentes molécules dans la voie métabolique et permet ainsi d'identifier la chronologie de leur biosynthèse et les étapes limitantes.

La question du transport des stilbènes et particulièrement du *t*-resvératrol était aussi un point important que nous souhaitons aborder. Malgré le nombre très important d'études portant sur le *t*-resvératrol et sa bioproduction, il n'y a actuellement aucun transporteur de *t*-resvératrol caractérisé. Ce transporteur sera recherché dans un premier temps sur des cellules de vigne en suspension par une approche globale de protéomique sur les protéines de la membrane plasmique, suivie d'une vérification des candidats par des analyses d'expression de gènes. Dans un second temps, cet outil pourra être utilisé pour évaluer la réponse de ce transporteur dans les racines transformées de vigne. Ces résultats seront complétés par des observations directes des stilbènes en microscopie à fluorescence et en microscopie confocale pour faire un lien entre leurs mécanismes de transport, leur localisation et leurs fonctions. La mise en évidence d'un tel transporteur pourrait avoir une importance toute particulière pour des questions de bioproduction et dans la compréhension des mécanismes de défense de la vigne.



De façon plus générale, le procédé développé permettra d'étudier le métabolisme racinaire de la vigne et ses interactions avec l'environnement, complétant ainsi les autres outils d'étude développés aux laboratoires SDRP et BIOPI. Enfin, si le procédé développé s'avère particulièrement adapté à l'accumulation de stilbènes après induction, il pourra être envisagé de tester sa mise en place à plus grande échelle pour en faire un outil de production.



## **Travaux, résultats et discussion**

---





# 1<sup>er</sup> Article : Etablissement des "Hairy roots" et caractérisation

---

La première étape nécessaire à la réalisation de ce projet a été l'initiation de lignées de racines transformées de vigne, leur stabilisation et la confirmation de leur transformation (intégration des gènes *Rol* dans le génome de la plante). Cette étape est le premier verrou à lever pour ce type d'études. En effet, selon l'espèce étudiée, le cultivar, les souches de *Rhizobacterium rhizogenes* et les méthodes d'infection testées, cette étape peut représenter un frein important au projet. Il est possible par exemple d'obtenir des racines transformées de certaines espèces telles que *Atropa belladonna*, *Nicotiana tabacum* ou encore *Datura inoxia* en quelques semaines, tandis que la transformation de plantes telles que *Panax vietnamensis* (Ha Thi, 2015) ou encore *Corydalis bracteata* (Khorodova, 2011) nécessitent une longue mise au point pouvant prendre de plusieurs mois à plusieurs années.

Des lignées de racines transformées de Pinot noir 40024 ont été obtenues par infection par *Rhizobium rhizogenes* ATCC 15834 par blessure d'explants foliaires avec un scalpel infecté ou par immersion d'explants blessés au préalable dans une suspension bactérienne. Ce cépage présente l'avantage d'être séquencé et possède des teneurs importantes en stilbènes. Après apparition de racines, celles-ci ont été cultivées sur milieu avec céfotaxime pour éliminer la bactérie, puis stabilisées avant confirmation de la transformation par PCR. Seules 9 lignées ont ensuite été sélectionnées pour leurs capacités de croissance. Leur taux de croissance faible a pu être amélioré en testant différents milieux de culture : B5, MS, MC, SH, non dilués et dilués au 1/2, ainsi qu'en testant des concentrations en saccharose (en tant que substrat carboné) allant de 1 % à 6 %. Les résultats ont montré une préférence des racines pour le milieu 1/2 SH et 2 % de saccharose. Ces conditions ont donc été choisies pour les autres expérimentations.

Les cinétiques de croissance et de production de stilbènes ont été évaluées dans ces conditions, montrant une croissance en 3 phases, sans phase de latence, avec une phase exponentielle durant environ 11 jours, atteignant un temps de doublement Td de 6,2 jours, suivi d'une phase de ralentissement puis une phase stationnaire après 31 jours. L'analyse de la production de stilbènes (picéide, resvératrol,  $\epsilon$ -viniférine et -viniférine) a montré une production basale, augmentant progressivement au cours de la croissance, puis fortement lors de la phase de ralentissement de la croissance avant de se stabiliser autour de 217  $\mu$ g de stilbènes accumulés par fiole de culture (20 ml et 1g de MF).



Afin d'évaluer la réponse des racines transformées de vignes aux principaux éliciteurs utilisées pour la bioproduction de stilbènes avec des cultures de cellules en suspension, l'application de différentes concentrations de MeJA et de CD ont été testées séparément puis en combinaison. Appliqué après 18 jours de culture, le MeJA à 100  $\mu$ M et 200  $\mu$ M a induit une forte augmentation de la production des stilbènes. Un traitement avec 100  $\mu$ M MeJA a permis d'atteindre une production de stilbènes de 757  $\mu$ g/g MF dans les racines et de 5 mg/l dans le milieu de culture après 4 jours, en comparaison, les contrôles correspondants ont produit 338  $\mu$ g/g MF et 0,4 mg/l respectivement. Un traitement avec 200  $\mu$ M MeJA a causé un brunissement important des racines suggérant une perte de viabilité. Malgré la meilleure production observée après 10 jours de traitement et avec 200  $\mu$ M MeJA, le traitement avec 100  $\mu$ M de MeJA pendant 4 jours a été retenu afin d'obtenir une bonne production tout en préservant la viabilité des racines.

Trois concentrations de méthyl-CD ont ensuite été évaluées : 30, 50 et 70 mM. Comme pour les traitements des cultures de cellules, les cyclodextrines ont été appliquées dès le début de la culture du fait de la quantité importante à dissoudre dans le milieu de culture. Le traitement avec 100  $\mu$ M MeJA a été réalisé après 18 jours de culture. Les cyclodextrines ont montré une forte inhibition de la croissance des racines couplée avec une induction importante de la production et de l'excrétion des stilbènes, atteignant des concentrations maximales en stilbènes totaux de 1034  $\mu$ g/g MF dans les racines traitées avec 30 mM CD et 100  $\mu$ M MeJA et 165 mg/l dans le milieu de culture des les racines traitées avec 50 mM CD et 100  $\mu$ M MeJA. Un traitement au MeJA seul induit un taux d'excrétion de stilbènes par rapport aux stilbènes totaux de plus de 30 % contre 5 % dans les contrôles et atteignant plus de 90 % avec l'ajout de CDs, indépendamment de l'ajout de MeJA.

En termes de production spécifique en stilbènes, on constate que les racines transformées de vigne sont capables d'atteindre 18,1 mg/g racines devant 13,4 mg/g cellules pour le maximum publié en cellules de vigne en suspension. Ces résultats montrent ce nouveau système comme un outil puissant pour l'étude et la production de stilbènes directement excrétés dans le milieu de culture et notamment des dérivés de resvératrol. Un travail de mise au point est encore nécessaire pour optimiser les conditions de culture et de production afin de permettre une synthèse efficace à plus grande échelle.

Ces données font l'objet d'une publication intitulée "**Enhanced Stilbene Production and Excretion in *Vitis vinifera* cv Pinot Noir Hairy Root Cultures**". *Article publié dans Molecules*.



Article

# Enhanced Stilbene Production and Excretion in *Vitis vinifera* cv Pinot Noir Hairy Root Cultures

Leo-Paul Tisserant <sup>1,2</sup>, Aziz Aziz <sup>2</sup>, Nathalie Jullian <sup>1</sup>, Philippe Jeandet <sup>2,\*</sup>, Christophe Clément <sup>2</sup>, Eric Courot <sup>2</sup> and Michèle Boitel-Conti <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Biologie des Plantes et Innovation EA 3900, SFR Condorcet FR CNRS 3417, UFR des Sciences, Ilot des Poulies, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France; leo-paul.tisserant@univ-reims.fr (L.-P.T.); nathalie.pawlicki@u-picardie.fr (N.J.)

<sup>2</sup> Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne EA 4707, SFR Condorcet FR CNRS 3417, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France; aziz.aziz@univ-reims.fr (A.A.); christophe.clement@univ-reims.fr (C.C.); eric.courot@univ-reims.fr (E.C.)

\* Correspondences: philippe.jeandet@univ-reims.fr (P.J.); michele.boitel@u-picardie.fr (M.B.-C.); Tel.: +33-3-913-341 (P.J.); +33-3-2282-7956 (M.B.-C.); Fax: +33-3-913-340 (P.J.); +33-3-227-648 (M.B.-C.)

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 14 October 2016; Accepted: 7 December 2016; Published: 10 December 2016

**Abstract:** Stilbenes are defense molecules produced by grapevine in response to stresses including various elicitors and signal molecules. Together with their prominent role in planta, stilbenes have been the center of much attention in recent decades due to their pharmaceutical properties. With the aim of setting up a cost-effective and high purity production of resveratrol derivatives, hairy root lines were established from *Vitis vinifera* cv Pinot Noir 40024 to study the organ-specific production of various stilbenes. Biomass increase and stilbene production by roots were monitored during flask experiments. Although there was a constitutive production of stilbenes in roots, an induction of stilbene synthesis by methyl jasmonate (MeJA) after 18 days of growth led to further accumulation of  $\epsilon$ -viniferin,  $\delta$ -viniferin, resveratrol and piceid. The use of 100  $\mu$ M MeJA after 18 days of culture in the presence of methyl- $\beta$ -cyclodextrins (MCDs) improved production levels, which reached 1034  $\mu$ g/g fresh weight (FW) in roots and 165 mg/L in the extracellular medium, corresponding to five- and 570-fold increase in comparison to control. Whereas a low level of stilbene excretion was measured in controls, addition of MeJA induced excretion of up to 37% of total stilbenes. The use of MCDs increased the excretion phenomenon even more, reaching up to 98%. Our results demonstrate the ability of grapevine hairy roots to produce various stilbenes. This production was significantly improved in response to elicitation by methyl jasmonate and/or MCDs. This supports the interest of using hairy roots as a potentially valuable system for producing resveratrol derivatives.

**Keywords:** *Vitis vinifera*; hairy roots; resveratrol; viniferins; methyl jasmonate; cyclodextrins

## 1. Introduction

Stilbenes have been the center of much attention over recent decades due to their valuable biological properties. The most studied stilbene, resveratrol, has been described as an important plant defense molecule, with antifungal and antibacterial activities [1–4]. Although stilbenes are found in grapevines at levels considerably lower than flavonoid-type compounds, they possess outstanding pharmaceutical properties [5] as antioxidants [6] as well as anticancer agents [7,8]. Resveratrol derivatives such as viniferins also show an interesting therapeutic potential, mainly in cancer treatment [9,10]. The main natural sources of resveratrol available on the market result from its extraction from Japanese knotweed (*Falliopa japonica*), which produces large quantities of piceid (a  $\beta$ -D-resveratrol glucoside), which is then de-glycosylated to obtain resveratrol [11,12]. Consumers'

preference indeed remains in favor of stilbenes from natural sourcing. Few resveratrol derivatives, except the dehydrodimer  $\epsilon$ -(+)-viniferin, are available and the current production of these derivatives does not yet meet the pharmaceutical market standards in terms of quantity and purity. Whereas the biosynthetic pathway of resveratrol has been very well characterized [13], those of many resveratrol derivatives are unknown. Currently, the sustainable production of resveratrol derivatives remains difficult to achieve due to their overall low concentrations in plant extracts and problems in purifying them. Alternative strategies including microorganism or plant cell cultures have been tested as valuable systems for stilbene sourcing [14]. Genetically engineered microorganisms or plants for the production of stilbenes would enable a cost-effective supply of these molecules, but the overall low yields and the still incomplete understanding of the biosynthetic pathways of complex stilbenes make their use of limited interest [15–17]. Moreover, there is a considerable interest in searching for sources of stilbenes without recombinant genetic modification. Grapevine cell suspensions, which can produce and excrete resveratrol into their culture medium, have led to promising results [18,19]. In grapevine cell systems in either flasks or bioreactors, resveratrol production can reach up to 7 g/L in response to elicitation treatments with various compounds such as signal molecules (jasmonate or methyl jasmonate) or chelating agents or drug carriers such as cyclodextrins (CDs) (for a review, see [18,19]).

The use of hairy roots offers the advantage of high genetic and biochemical stabilities of organ culture systems coupled with growth rates similar to those of cell suspensions [20,21], without the need for plant growth regulators. In this context, hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea*) and Muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) have already been developed [22–24]. Both of these plants have previously been described as naturally producing resveratrol and resveratrol derivatives [25]. Although stilbenes have been described in various taxonomically unrelated species, the highest molecular diversity within this chemical group has been found in the *Vitis* spp. genus [26]. Use of the sequenced cultivar *Vitis vinifera* cv Pinot Noir 40024 hairy roots thus appears a good tool for a comprehensive analysis of the organ-specific biosynthesis of stilbenes. Moreover, Pinot Noir has been reported as naturally producing high levels of stilbenes in canes [27] and berries [28].

In this study, we describe the establishment of *Vitis vinifera* cv Pinot Noir PN 40024 hairy root lines from in vitro plantlets. Various culture conditions were tested and the growth kinetics were defined in those yielding the highest growth rate. The ability of *Vitis vinifera* hairy roots to produce and excrete various stilbenes was monitored during growth kinetics experiments in response to methyl jasmonate (MeJA) or CD treatment alone or in combination.

## 2. Results and Discussion

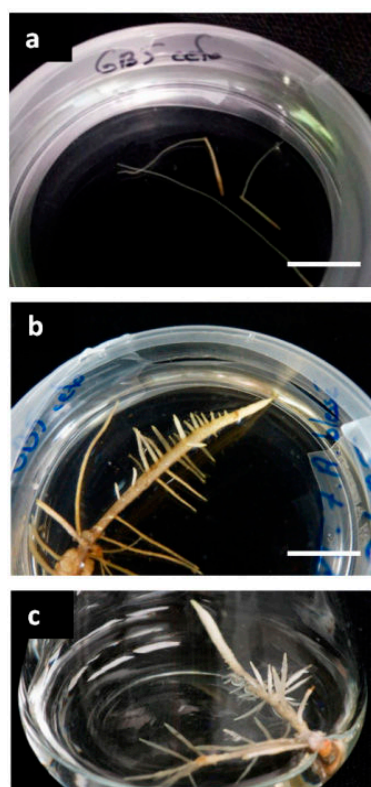
### 2.1. Establishment of Hairy Root Lines (HRs)

As suggested by some previous results [29], the transformation of *Vitis* spp. by *R. rhizogenes* is very dependent on species, on the bacterial strain used as well as the explants tested. In this study, only the sequenced grapevine cultivar PN 40024 [30] was tested, as it represents particular interest for research purpose. Two different bacterial strains were tested to infect various explants from in vitro plantlets. The phytohormone 2,4-D was used to make plant cells more competent, as previously reported in *Arabidopsis thaliana* and *Beta vulgaris* L. [31,32].

Leaves with petioles and stem explants of plantlets of *V. vinifera* PN 40024 transformed using *Rhizobium rhizogenes* ICPBTR7, led to a rapid loss of viability of the explants and thus yielded no roots either by immersion or wounding of the explants or by direct pricking of the plantlets. The plantlets pricked with an infected needle showed no development of roots regardless of the strain used.

Only the Pinot Noir leaves and stem explants transformed with *R. rhizogenes* ATCC15834 by immersion in the bacterial suspension or by wounding with an infected scalpel yielded a particularly large amount of transformed roots. Over the 200 explants tested, several hundreds of roots developed after two weeks, mostly along the petioles and leaf veins.

Once isolated on solid B5 medium supplemented with 3% sucrose, these lines showed a slow growth rate during the first weeks of culture and grew thinner over time until death after two months (Figure 1a). These roots were probably adventitious roots due to the very well-known rooting ability of grapevine and as a result of the addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the bacterial suspension used to infect the explants. A second series of roots appeared on the same Pinot Noir explants four weeks after infection with *R. rhizogenes* ATCC 15834 using the two previous methods. Once they were 1–2 cm long, roots were isolated and cultivated on solid B5 medium supplemented with 3% sucrose (B5-30). These roots showed a completely different phenotype from the first ones, with a diameter ranging from 1 to 3 mm and a higher branching rate (Figure 1a,b). This phenotype showed some similarity to that described on Muscadine grape, with thick roots, very short root hairs, and a higher branching rate (10–15 branches per 5 cm) compared to the 4–5 branches per 5 cm for Muscadine HRs, as reported in a previous work [24]. In the second series of roots that appeared, 80 different lines were isolated and cultivated on B5-30 solid medium. The 60 lines displaying the best growth rates were then transferred to a B5-30 liquid medium (Figure 1c) to be further selected on growth capacity. Nine lines were thus conserved and their transformation was verified by confirmation of the presence of transferred *rolC* gene and the absence of *virD2* bacterial virulence gene (Figure S1). As few differences in terms of phenotype, growth rate and phytochemical profile were observed between these lines (data not shown), the root line 19A was chosen as representative and used further.

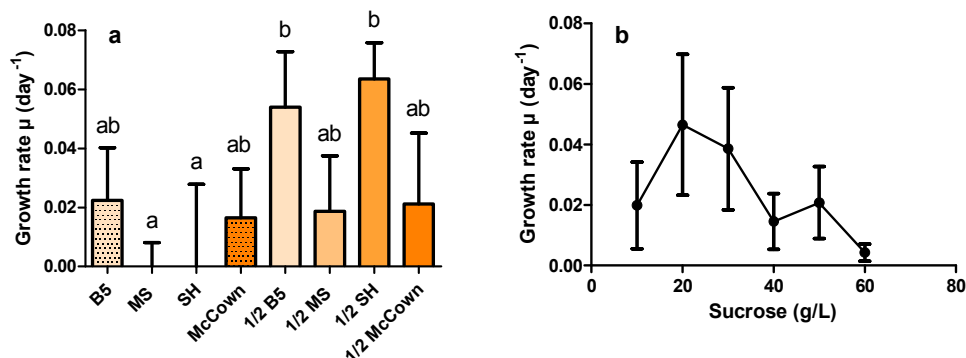


**Figure 1.** Observations of the different phenotypes of roots isolated:(a) roots from the first series isolated after the second subculture (28 days); (b) roots from the second series isolated after the second subculture (21 days of culture); and (c) roots from the second series after 40 days growth in 100-mL shaken flasks with 20 mL culture medium. Bars represent 1 cm.

## 2.2. Effects of Culture Medium and Sucrose Concentration on HR Growth

The composition of the medium used is known to have an important impact on the growth capacity and secondary metabolite production of *in vitro* cultures. The observed slow growth of the selected lines strongly suggested that the medium composition could be further improved. To search

for better culture conditions, four commonly used culture media, Gamborg (B5), McCown (MC), Murashige and Skoog (MS), Schenk and Hildebrandt (SH), and their half-strength dilutions, were compared. In addition, six different sucrose concentrations ranging from 1% to 6% were tested (Figure 2).



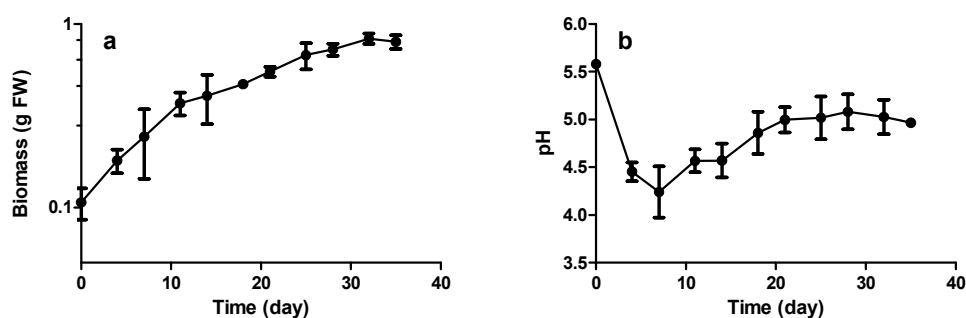
**Figure 2.** Effects of media and sucrose concentration on HR growth rate: (a) effect of various standard media and 1/2 dilutions, with 3% sucrose on the growth rate of line 16C; and (b) effect of sucrose concentrations in B5 medium on the growth of line 19A. Average growth rate  $\mu$  and its standard error were calculated from weight measurements made over 35 days with renewal of culture media every three or four days. Each point is composed of three biological replicates. Statistical differences were tested using ANOVA ( $\alpha = 5\%$ ). Letters above dataset point out statistically different groups.

A preference for 1/2 media seems to occur regardless of the medium tested (Figure 2a). Only the B5 and MC media enabled growth when non-diluted. Amongst the 1/2 media, it would seem that the SH medium yielded the best growth rate ( $\mu$ ), reaching  $\mu = 0.063 \text{ day}^{-1}$  (doubling time,  $T_d = 10.9$  days), along with B5. Determination of the growth rate using different sucrose concentrations in the B5 medium (Figure 2b) showed that the range of 1% to 3% sucrose concentrations in the medium seems to be the most effective, reaching a growth rate of  $0.046 \text{ day}^{-1}$  (doubling time  $T_d = 14.9$  days) for 2% sucrose. As well as showing a low growth rate, the roots grown on medium with 5% and 6% sucrose started browning after three weeks, suggesting significant stress under these conditions. This effect could be caused by an osmotic stress due to high sugar concentrations [33]. Thus, 1/2 SH medium with 2% sucrose was used for further experiments.

### 2.3. Growth and Stilbene Production Kinetics

#### 2.3.1. Biomass Production

The growth kinetics were evaluated using line 19A in the improved growth conditions of 1/2 SH medium with 2% sucrose (Figure 3).



**Figure 3.** Increase in: biomass (fresh weight) (a); and pH (b) during growth kinetics. Each point represents the mean with standard deviation of three biological replicates.

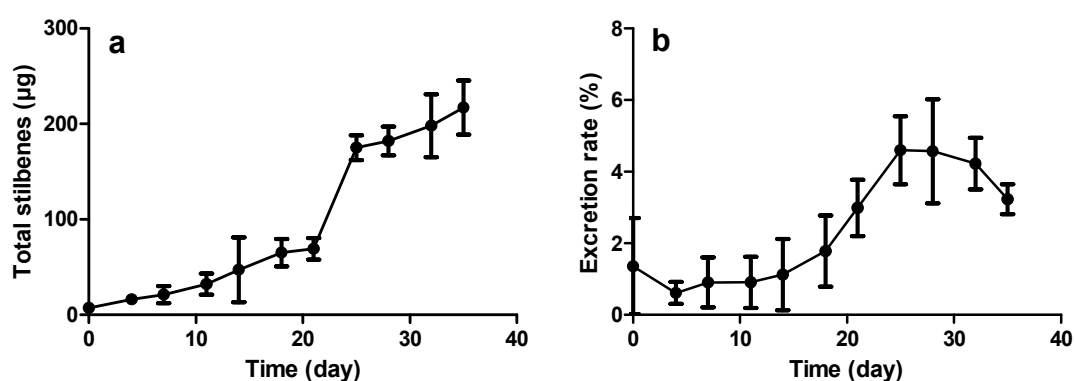


The semi-log representation of the growth curve (Figure 3a) of grapevine HRs shows no significant lag phase, starting directly with an exponential growth phase up to Day 11, followed by a slowing phase until Day 31 and a stationary phase up to Day 35. The rapid diminution in growth could be due to the relatively low amounts of sucrose in the culture medium. Figure 3b displays a rapid fall in the pH during the first days of culture up to 4–7 days. The pH then rises to 5 at day 20 before stabilizing, in the phases corresponding to both the slower growth and the stationary phases. This suggests that pH can be used as a rapid, non-destructive tool to monitor growth in grapevine HR cultures.

Growth rate was calculated between Day 0 and Day 11, giving a  $\mu$  value of  $0.11 \text{ day}^{-1}$  ( $T_d = 6.2$  days). In comparison, peanut and Muscadine HRs have been reported to have a doubling time of 10.2 and 10.7 days, respectively, without any addition of growth regulators [23,24].

### 2.3.2. Constitutive Stilbene Production in Roots

The analysis of stilbenes during the time course experiments shows that a basal production takes place in roots (Figure 4), where they probably play a role as phytoanticipins as already mentioned in natural grapevine roots as well as in the perennial parts of the plant [34].



**Figure 4.** Stilbene production during growth kinetics: (a) total production of stilbenes ( $\mu\text{g}$  of stilbenes per culture flask); and (b) excreted stilbenes as a proportion of total stilbenes. Each point represents the mean with standard deviation of three biological replicates.

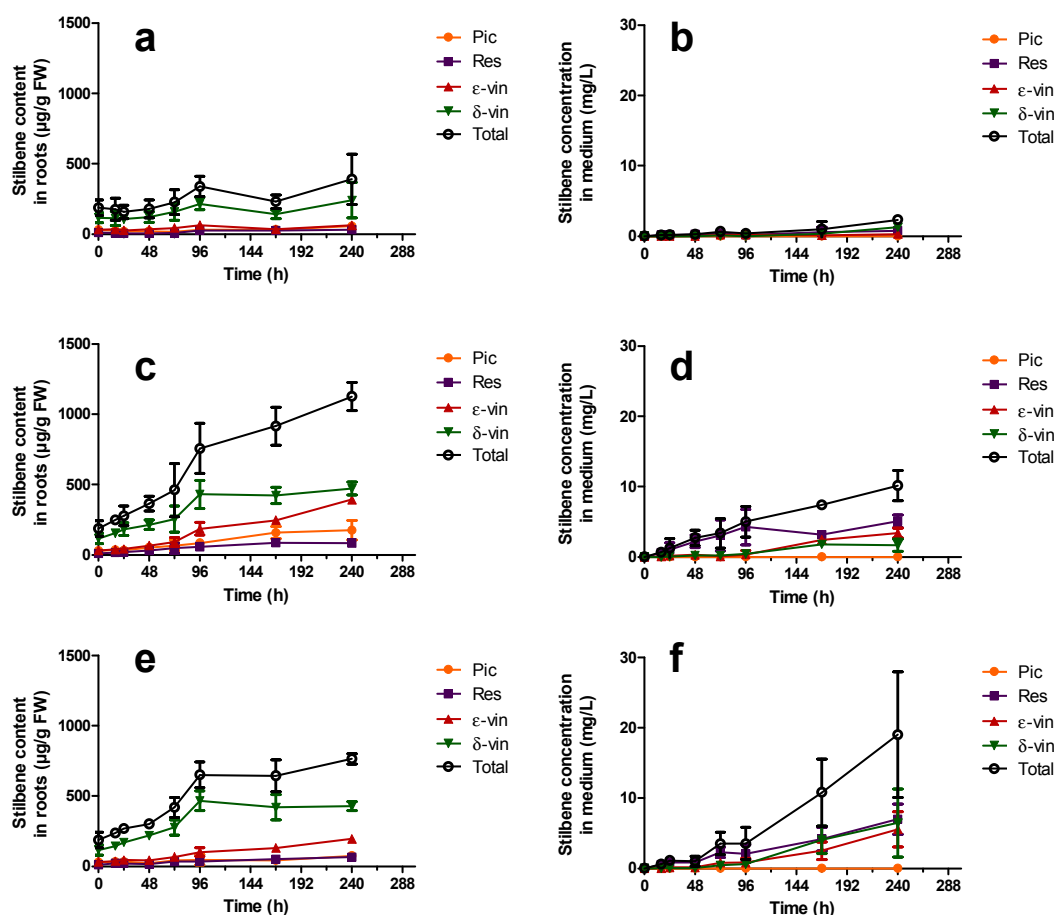
Here, only the resveratrol glucoside, piceid, resveratrol, and the two dehydrodimers,  $\epsilon$ -viniferin and  $\delta$ -viniferin, were quantified using external standards. Further use of the term “total stilbenes” refers to the sum of all these molecules. A close relationship between the growth phase and the production of secondary metabolites in roots can be observed, especially when the metabolism tends to switch from primary to secondary at the end of the exponential growth phase. As shown in Figure 4a, the basal production of stilbenes per flask rises slowly until the end of the exponential phase at Day 21, before rapidly increasing up to  $175 \mu\text{g}$  at Day 25 and  $217 \mu\text{g}$  after 35 days. It is interesting to note the same trend in the proportion of excreted stilbenes (Figure 4b). The low proportion of 1%–5% excreted stilbenes vs. total stilbenes is consistent with those measured in similar systems without elicitation [23,24].

## 2.4. Induction of Stilbene Production in HRs in Response to Various Elicitors

### 2.4.1. Elicitation with Methyl Jasmonate

Stilbene production, and particularly that of resveratrol, is known to be strongly induced by various environmental stresses, signaling molecules and drug transporters [19,35]. Such compounds have been used in various plant cell systems to mimic a stress and thus induce the production of numerous metabolites of interest [14,36,37]. Amongst them, the jasmonic acid ester, methyl jasmonate (MeJA), has been shown to induce stilbene production mainly in grapevine cell suspensions [38–47].

Figure 5 shows the response in terms of stilbene production in roots and in the culture medium following treatment with 100  $\mu\text{M}$  MeJA up to 10 days after induction. Addition of 0.1% EtOH (*v/v*) (corresponding to the alcoholic content upon addition of MeJA) to the control cultures shows no significant effect of the solvent on root or medium stilbene contents. All stilbene production values in roots were expressed here as micrograms per gram of fresh weight. In order to relate the obtained data with root dry weight, we determined during replicate experiments the ratio dry root weight over fresh root weight which was in the order of  $16\% \pm 7\%$ . As a result, stilbene production in  $\mu\text{g/g}$  DW can be obtained by multiplying stilbene production in  $\mu\text{g/g}$  fresh weight (FW) by a factor of around 7.



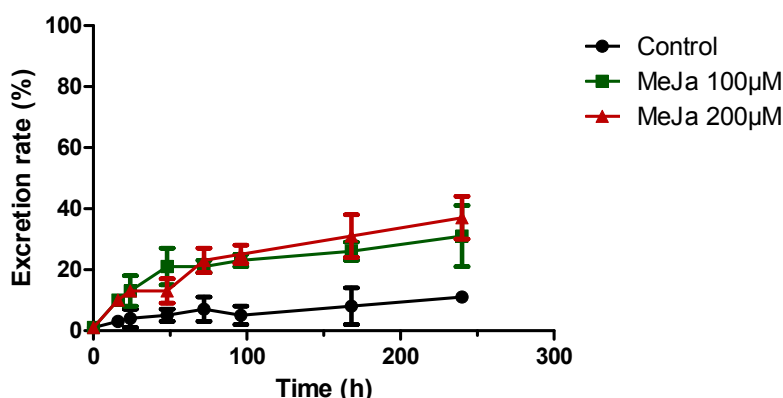
**Figure 5.** Amounts of stilbenes produced after 18 days of culture following MeJA elicitation in: HRs (a,c,e); and in the culture medium (b,d,f). (a,b) EtOH at 0.1% was used as the control; (c,d) 100  $\mu\text{M}$  MeJA; and (e,f) 200  $\mu\text{M}$  MeJA. Pic: piceid (●); Res: Resveratrol (■); ε-vin: ε-viniferin (▲); δ-vin: δ-viniferin (▼); Total (○) (sum of previous stilbenes). Each point represents the mean with standard deviation of three biological replicates.

Figure 5a displays a basal stilbene production in roots of around 200  $\mu\text{g/g}$  FW, reaching up to 390  $\mu\text{g/g}$  FW 10 days after elicitation. The low stilbene concentrations measured in the extracellular medium, reaching a maximum of 2.3 mg/L at Day 10, are consistent with those previously described [23,24]. However, application of MeJA at doses of 100  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$  has a clear inducing effect on the stilbene contents of both the roots and the extracellular medium. Unlike described in peanut hairy roots treated with MeJA, the stilbene concentration in the culture medium did not reach its maximum after 12–48 h and no fall in concentration was observed during the tested period [22]. One hundred micromoles of MeJA (Figure 5c) gives rise to a quick increase in the stilbene root content between two and four days after induction, reaching 757  $\mu\text{g/g}$  FW and followed by a steady increase up

to 1126  $\mu\text{g/g}$  FW after 10 days, corresponding to 2.2- and 2.9-fold increases respectively in comparison to control.

In the extracellular medium (Figure 5d), 100  $\mu\text{M}$  MeJA causes a similar effect, reaching stilbene contents of 5 and 10 mg/L after four and 10 days of treatment, corresponding to 12.6- and 4.3-fold increases, respectively, in comparison to control. Application of 200  $\mu\text{M}$  MeJA shows a comparable effect on the total stilbene root content up to Day 4, reaching 650  $\mu\text{g/g}$  FW (Figure 5e), although stabilizing afterwards. The browning of the roots observed upon treatment with 200  $\mu\text{M}$  MeJA suggests a possible effect of this compound on root viability and biomass, as previously reported in *Brassica* hairy root cultures [48]. However, only the treatment with 100  $\mu\text{M}$  MeJA displays statistically significant differences in biomass in comparison to the control 10 days after elicitation. Quantification of the corresponding excreted stilbenes again shows a response similar to the use of 100  $\mu\text{M}$  MeJA until Day 4, reaching 3.5 mg/L. The stilbene concentration then rises to 19 mg/L at Day 10 (Figure 5f), which corresponds to 8.8- and 8.1-fold increases, respectively, in comparison to control. This observation is probably due to a release of intracellular stilbenes into the medium. All the data indicate that four days following MeJA treatment is the best timing, i.e. when induction is at a maximum and to minimize a possible detrimental effect of MeJA on root viability. For further experiments, stilbene measurements were thus carried out four days after MeJA induction. Excretion rates of stilbenes are also significantly affected by MeJA treatments (Figure 6).

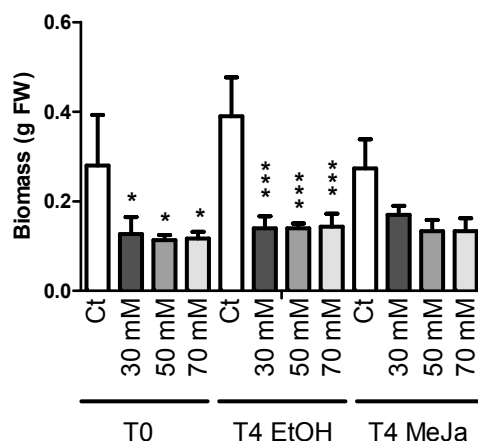
While the control excretion rate rises slowly from 1% to 11% of total stilbenes in 10 days, the cultures with MeJA display excretion rates of 31% and 37% for 100  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$  MeJA, respectively, after 10 days. No piceid was found in the medium of MeJA-treated roots and less than 10% of  $\delta$ -viniferin was excreted while almost 30%  $\epsilon$ -viniferin and 60% of resveratrol produced were found in the culture medium (Figure S2).



**Figure 6.** Proportion of stilbenes in the culture medium over time in control cultures (●) and cultures treated with 100  $\mu\text{M}$  (■) or 200  $\mu\text{M}$  MeJA (▲). Each point represents the mean with standard deviation of three biological replicates.

#### 2.4.2. Elicitation Experiments with Cyclodextrins and/or Methyl Jasmonate

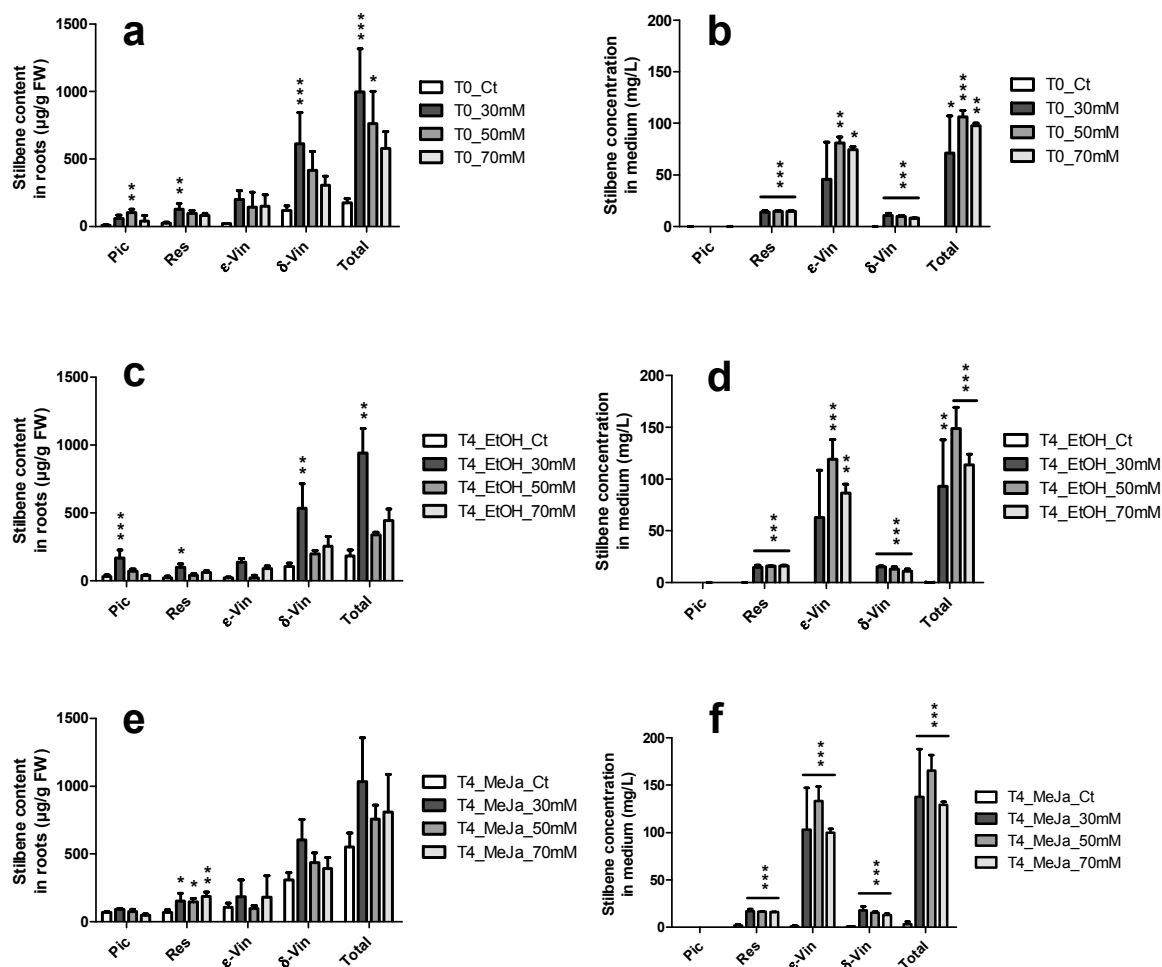
Cyclodextrins (CDs) and particularly methyl- $\beta$ -CDs (MCDs) have also been described as strong inducers of stilbene production in grapevine cell suspensions [49]. They have been reported to display a synergistic effect when used in combination with MeJA [35,41,50–53]. However, their effect on the production of stilbenes in grapevine HRs is unknown as yet. The effect of CAVASOL<sup>®</sup> W-7 MCDs alone or in combination with MeJA was evaluated on both root growth (Figure 7) and stilbene content (Figure 8). UPLC chromatograms are displayed in Figure S3.



**Figure 7.** Effect of eliciting treatments on the biomass. The tested MCD concentrations were 0, 30, 50 and 70 mM. One hundred micromoles of MeJA and EtOH 0.1% were applied after 18 days of culture and for four days. Each point represents the mean with standard deviation of three biological replicates. Each value was compared to its corresponding control using ANOVA test (\*  $p < 0.5$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). Biomasses of different controls were not statistically different.

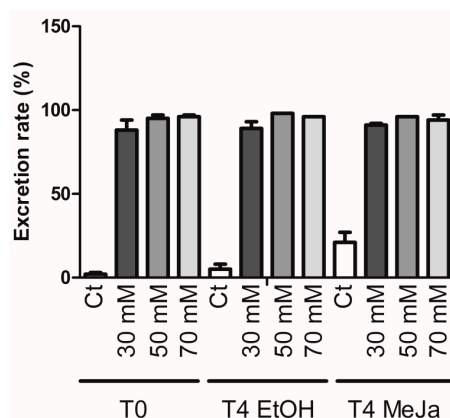
CD concentrations used were chosen according to previous reports showing high stilbene production levels using grapevine cell suspensions [51,54,55]. Due to the high MCD concentrations applied, these were prepared directly in the culture medium before autoclaving. The HRs were thus cultivated with 0, 30, 50 or 70 mM MCD for 18 days before treatment with MeJA. Measurements were made four days after the application of MeJA. Figure 7 shows a strong effect of MCDs on HR growth at concentrations of 30, 50 and 70 mM, with almost no growth during the first culture phase of 18 days. MeJA treatment inhibited the growth of roots without MCDs but had no additional effect when applied on cultures containing MCDs. Previous results obtained for grapevine cell suspensions treated with 50 mM MCDs described a detrimental effect of the latter alone on cell growth [51]. MeJA treatment is known to have an even stronger inhibitory effect on the growth of grapevine cell suspension cultures [18,19,39,42,56]. Similar observations were made on HR cultures of *Scutellaria lateriflora* [57]. The use of MCDs on HRs has been reported to enhance the production of other phenolic compounds in *S. lateriflora* and to induce the production of stilbenes including resveratrol and derivatives such as prenylated arachidin-1 and arachidin-3 in peanut hairy root cultures [22].

Different elicitors were tested on those cultures, including sodium acetate,  $H_2O_2$  as well as MeJA, CD or the combination of both. The best stilbene production in this system was achieved with 100  $\mu$ M MeJA in combination with 9 g/L MCD, reaching 249 mg/L stilbenes excreted in the culture medium with a majority of arachidin-1 and arachidin-3. The use of MCDs on grapevine HR cultures displays a large induction effect on stilbenes accumulated in roots and excreted into the medium (Figure 8). After 18 days of culture, a clear increase in all quantified stilbenes in roots treated with MCDs was observed: control roots showed intracellular concentrations of 175  $\mu$ g/g FW. In contrast, MCD-treated roots contained 999, 762 and 580  $\mu$ g stilbenes/g FW before MeJA treatment for 30, 50 and 70 mM MCDs, respectively. The concentrations of stilbenes measured in the culture medium were 0.1 mg/L for the control and 71, 106, and 98 mg/L for the same CD-treated cultures. These concentrations represent an increase of stilbene production in comparison to control of 5.7, 4.4 and 3.3 folds in the roots and of 711, 1060 and 980 folds in the culture medium (Figure S4).



**Figure 8.** Amounts of stilbenes produced in response to treatments with MCDs in the culture media over time. Stilbene measured in HRs and in the culture medium, respectively: (a,b) after 18 days of culture and before applying 100  $\mu$ M MeJA or EtOH; (c,d) four days after applying EtOH; and (e,f) four days after applying MeJA at 100  $\mu$ M. Each point represents the mean with standard deviation of three biological replicates. Pic: piceid; Res: resveratrol;  $\epsilon$ -vin:  $\epsilon$ -viniferin;  $\delta$ -vin:  $\delta$ -viniferin. Each value was compared to its corresponding control using ANOVA test (\*  $p < 0.5$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

The MeJA treatment was applied after 18 days of culture and its effect was measured four days afterwards. Addition of 100  $\mu$ M MeJA induced further accumulation of stilbenes in the roots and the culture medium (Figure 8), as previously reported in grapevine cell suspensions [18,19]. Control roots and medium contained 183  $\mu$ g/g FW and 0.3 mg/L stilbenes, respectively, after four days. A maximum production of stilbenes in roots was observed for roots treated with 30 mM MCDs and 100  $\mu$ M MeJA, reaching up to 1034  $\mu$ g/g FW total stilbenes after four days, which represents a 5.6-fold increase in production. In the medium, the highest stilbene concentrations were observed in the cultures treated with 50 mM MCDs and 100  $\mu$ M MeJA, which yielded up to 165 mg/L total stilbenes after four days, corresponding to an increase of 571 folds in excreted stilbenes. The measured rates of excreted stilbenes show extremely high values of more than 90% of total stilbenes for all three tested MCD concentrations (Figure 9).  $\delta$ -viniferin was slightly less excreted, with 80% found in the extracellular medium and piceid which remains mostly intracellular (Figure S3b).



**Figure 9.** Excreted stilbenes as a proportion of total stilbenes in response to MeJA, MCDs and in combination. Each point represents the mean with standard deviation of three biological replicates.

These data support the fact that, besides their well-known eliciting effects on stilbene production, MCDs facilitate the outflow of stilbenes by increasing their solubility in the medium [58]. Although 30 mM MCDs leads to the highest stilbene content in roots, a dose of 50 mM is more suitable due to the high quantity of excreted stilbenes obtained. In fact, high yields of excreted stilbenes facilitate their extraction from the cultures. Production of resveratrol reaching up to 5 g/L has been reported using MCDs in grapevine cell suspensions [59]. Although the use of HRs presents unique advantages, this system still needs further optimization in terms of growth conditions to reach similar stilbene concentrations. For example, the biomass reported here with HRs was 8 g FW/L after 18 days of culture with MCDs. In comparison, grapevine cell suspensions can reach up to 500 g FW/L [19]. Various approaches could be used to improve growth and thus biomass production before elicitation to reduce this limitation. A thorough optimization of the culture medium, by identifying limiting nutrients and potential growth factors, could lead to an improvement of growth. In the same way, growth conditions can be modified to optimize gas transfers, by shaking or changing the volume of the cultures. Comparing specific stilbene production in grapevine cell suspensions shows a total stilbene production of 13.4 mg/g FW [53], whereas it reached 18.1 mg/g FW in grapevine HRs, demonstrating that this system could represent a promising tool for stilbene production.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Plant and Bacterial Materials

Six-week-old *in vitro* plantlets from *Vitis vinifera* cv Pinot Noir 40024 were used for the transformation experiments. They were cultivated in a 16 h/8 h day/night photoperiod on McCown Woody Plant Medium (Dushefa, Haarlem, The Netherlands). All plant cultures were kept at 23 °C.

Two bacterial strains were tested: *Rhizobium rhizogenes* strain ATCC 15834 and *Rhizobium rhizogenes* ICPB TR7. The cultures were initiated in 10 mL Yeast Mannitol Broth YMB medium [60] for 24 h at 28 °C before being pelleted and resuspended in 20 mL in the corresponding plant medium supplemented with 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). 2,4-D was used to induce a short dedifferentiation to facilitate transformation [31,32]. The explants tested consisted of entire leaves with petioles or 1-cm-long sections of the stem. For plant infection, three different methods were compared: (1) wounding explants with a scalpel previously infected with the bacterial suspension; (2) immersing wounded explants in the bacterial suspension for 5 min; and (3) directly pricking 24 *in vitro* plantlets with an infected needle on 3 spots of the stem.

After infection, explants were transferred onto solid B5 medium [61] and co-cultivated in darkness. After 48 h, the explants were rinsed in B5 + 600 mg/L cefotaxime and cultured on solid B5 medium 3% sucrose supplemented with 300 mg/L cefotaxime. When the first roots appeared on the explants, and



measured 1 cm or more, they were isolated and cultured on B5 medium + 300 mg/L cefotaxime. They were grown for 3 months on solid B5 medium + 300 mg/L cefotaxime and subcultured every 3 weeks, then transferred to liquid B5 medium + 300 mg/L cefotaxime. Each line was routinely subcultured every 40 days and the medium was changed every 10 days. The antibiotic pressure was removed 4 months after isolation, once the absence of *Rhizobacteria* was confirmed by PCR.

### 3.2. Confirmation of the Genetic Transformation

The status of genetically transformed roots was verified by PCR, by searching for the *rolC* transgene and the absence of bacterial *virD2*. Primer characteristics are described in Table 1 and sequences were taken from data available in the literature [62,63]. Specific amplification was achieved using Firepol<sup>®</sup> polymerase (Solis Biodyne) with a thermal cycler (Progene, Thechne): 12 min activation at 95 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 56 °C and 45 s at 72 °C, and a final 2 min extension time at 72 °C. The bacterial strain was used as a double positive control, a wild type *Escherichia coli* strain was used as a double negative control and *Brassica rapa* hairy roots were used as a transformation-positive control [64].

**Table 1.** Sequences of primers used for confirmation of the genetic transformation [61,63].

Primer	Direction	Sequence
<i>rolC</i>	Forward	5'-ATGGCTGAAGACGACCTGTG-3'
	Reverse	5'-TAGCCGATTGCAAACCTTGCAC-3'
<i>virD2</i>	Forward	5'-ATGCCCGATCGAGCTCAAG-3'
	Reverse	5'-GACCCAAACATCTCGGCTG-3'

### 3.3. Improvement of Growth Conditions

The best medium and sucrose concentrations tested were determined in non-limiting conditions. Each culture was started in 100-mL flasks, containing 20 mL medium and one primary root tip of approximately 2 cm. They were cultivated at 110 rpm in darkness for 35 days. Weight measurements and medium renewal, to avoid excessive medium loss over time, were carried out every 3 or 4 days. All tests were done in triplicate.

The tested media were MS [65], B5 [61], MC which is used to cultivate *Vitis vinifera* cv Pinot Noir in vitro plantlets [66] and SH [67] as well as 1/2 MS, 1/2 B5, 1/2 MC and 1/2 SH containing 3% sucrose. The different sucrose concentrations tested were 1%, 2%, 3%, 4%, 5% and 6% in B5 medium.

The growth rate  $\mu$  was determined from the exponential trend line of the mean growth curve, with biomass equation  $X = X_0 e^{\mu(t-T_0)}$ . The doubling time  $T_d$  was calculated using  $T_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$  [68].

### 3.4. Growth Kinetics

The growth kinetic parameters were calculated from cultures in 100-mL flasks, containing 20 mL 1/2 SH medium with 2% sucrose, inoculated with two primary root tips of approximately 2 cm. Three flasks were used for each point to determine the fresh weight. Roots and media were stored at  $-20$  °C for stilbene quantification. The growth rate  $\mu$  was calculated using the slope of the curve given by mean values of triplicates.

### 3.5. Stilbene Extraction

Stilbenes were extracted from the medium as described in [69,70]. Liquid–liquid extractions using 10 mL ethyl acetate for 10 mL medium were carried out. Ethyl acetate phases were then collected, evaporated in a rotavapor (Laborota 4000-Efficient, Heidolph with PC3001 VARIO vacuum pump, Vacuubrand, Schwabach, Germany) and the extracts were resuspended in 1 mL methanol (MeOH) for UPLC quantification.

Stilbene extraction from roots was adapted from [69,70] using roots ground in liquid nitrogen. One hundred micrograms was weighed and extracted with 1 mL 85% MeOH for 2 h in a thermoshaker at 850 rpm, then centrifuged. The supernatant was collected in a glass tube and the pellet was resuspended in 1 mL 100% MeOH for 1 h with a thermomixer (Eppendorf) at 850 rpm, and then centrifuged. The supernatants were pooled, evaporated in a Vacuum Concentrator 5301 (Eppendorf) and resuspended in 1 mL MeOH for UPLC quantification.

### 3.6. UPLC Analysis

UPLC analyses were done using an Acquity UPLC (Waters, Guyancourt, France) system, with a C18 Cortecs<sup>®</sup> (Waters) column (2.1 × 100 mm, particles: 1.6 μm, pore size: 90 Å), maintained at 30 °C. The separation conditions were taken from [68]. Briefly, a gradient at 0.5 mL/min starting from 90% H<sub>2</sub>O +0.1% formic acid (A) and 10% acetonitrile +0.1% formic acid (B) to 40% A and 60% B, followed by 5 min rinsing was used. Stilbene fluorescence was measured with an Acquity fluorometer (Waters) with an excitation wavelength of 330 nm and an emission wavelength at 375 nm. Piceid (3-O-β-D-resveratrol glucoside), resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene), δ- and ε-viniferins (resveratrol dehydrodimers), in both their *cis* and *trans* forms, were identified and quantified as described previously and used as external standards [71,72]. Resveratrol, piceid and ε-viniferin were purchased from Sigma at the time of the experiments. Supplementary data concerning stilbene identification are available in [73]. Quantification of piceid and resveratrol was expressed as *trans*-resveratrol equivalents and that of δ and ε-viniferins as *trans*-ε-viniferin equivalents. All extractions were done in subdue light to limit isomerization of *trans* stilbenes to the *cis* forms. The concentrations shown are the sum of *cis* and *trans* forms measured. Total stilbenes represent the sum of these stilbenes.

### 3.7. Induction Treatments

Methyl jasmonate (MeJA) (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) was added to the culture medium (1/2 SH supplemented with 2% sucrose) from an ethanol (EtOH) solution after the exponential growth phase, corresponding to 18 days of culture. Final concentrations at 100 μM and 200 μM were chosen, with a maximum concentration of 0.1% EtOH in the medium. Controls were obtained by addition of EtOH to a final concentration of 0.1%. All experiments were conducted in triplicate.

For the MeJA and CD experiments, CAVASOL<sup>®</sup> W-7 MCDs (WackerChemie AG, Burghausen, Germany) were dissolved in the culture medium (1/2 SH supplemented with 2% sucrose) to final concentrations of 30 mM, 50 mM and 70 mM before autoclaving and MeJA was added after 18 days at a final concentration of 100 μM.

## 4. Conclusions

Hairy root systems are particularly attractive as study and bioproduction tools due to their specific properties such as high genetic and phytochemical stability, good growth rates and their highly controlled environment.

In the present work, the growth and phenotype of grapevine cv Pinot Noir HRs has been reported. Moreover, their ability to respond to elicitation treatments that lead to the significant production and excretion of stilbenes into the culture medium has been demonstrated. The results show that grapevine hairy root cultures are able to provide high yields of secreted stilbenes, particularly ε-viniferin, when treated with methyl jasmonate and MCDs. This makes them a good candidate for the production of highly pure stilbenes. The up-scaling of such systems has already been proven feasible [74] and achieved by different companies (10,000 L *Panax* bioreactor) [75].

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/12/1703/s1>.

**Acknowledgments:** This research was supported by the SFR Condorcet and funding was provided by the "Région Champagne Ardenne". We thank Carol Robins for English corrections to the manuscript.



**Author Contributions:** Leo-Paul Tisserant conducted experiments and wrote the manuscript; Aziz Aziz helped in performing experiments with stilbene extraction and analysis by UPLC; Nathalie Jullian helped to obtain HR and analyzed the data about the HR cultures; Philippe Jeandet analyzed the data and edited the whole manuscript; Christophe Clément and Eric Courot designed research about *V. vinifera* and elicitation; Michèle Boitel-Conti designed research and analyzed data about HR cultures of *V. vinifera* (HR obtained and characterized stilbenoid production in in vitro cultures). All authors read and approved the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

B5	Gamborg medium
CD	Cyclodextrin
HR	Hairy roots
JA	Jasmonate
MeJA	Methyl jasmonate
MS	Murashige and Skoog medium
SH	Schenk and Hildebrandt medium

## References

1. Adrian, M.; Jeandet, P. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1345–1350. [[PubMed](#)]
2. Adrian, M.; Jeandet, P.; Veneau, J.; Weston, L.A.; Bessis, R. Biological activity of resveratrol a stilbenic compound from grapevines against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 1689–1702. [[CrossRef](#)]
3. Chalal, M.; Klinguer, A.; Echairi, A.; Meunier, P.; Vervandier-Fasseur, D.; Adrian, M. Antimicrobial activity of resveratrol analogues. *Molecules* **2014**, *19*, 7679–7688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Paulo, L.; Oleastro, M.; Eugenia Gallardo, E.; Queiroz, J.A.; Domingues, F. Antimicrobial properties of resveratrol: A review. In *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*; Méndez-Vilas, A., Ed.; Research Center: Badajoz, Spain, 2015; pp. 1225–1237.
5. Pezzuto, J.M. The phenomenon of resveratrol: Redefining the virtues of promiscuity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *1215*, 123–130. [[CrossRef](#)]
6. Santos, J.A.; de Carvalho, G.S.G.; Oliveira, V.; Raposo, N.R.B.; da Silva, A.D. Resveratrol and analogues: A review of antioxidant activity and applications to human health. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* **2013**, *5*, 144–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Aluyen, J.K.; Ton, Q.N.; Tran, T.; Yang, A.E.; Gottlieb, H.B.; Bellanger, R.A. Resveratrol: Potential as anticancer agent. *J. Diet. Suppl.* **2012**, *9*, 45–56. [[PubMed](#)]
8. Pervaiz, S.; Holme, A.L. Resveratrol: Its biologic targets and functional activity. *Antioxid. Redox Signal.* **2009**, *11*, 2851–2897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Xue, Y.Q.; Di, J.M.; Luo, Y.; Cheng, K.J.; Wei, X.; Shi, Z.; Xue, Y.Q.; Di, J.M.; Luo, Y.; Cheng, K.J.; et al. Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2014**, *2014*, 765832. [[CrossRef](#)]
10. Giovannelli, L.; Innocenti, M.; Santamaria, A.R.; Bigagli, E.; Pasqua, G.; Mulinacci, N. Antitumoural activity of viniferin-enriched extracts from *Vitis vinifera* L. cell cultures. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 2006–2016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Vastano, B.C.; Chen, Y.; Zhu, N.; Ho, C.T.; Zhou, Z.; Rosen, R.T. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 253–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Waterhouse, A.L.; Lamuela-Raventós, R.M. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 571–573. [[CrossRef](#)]
13. Lu, D. Relevant enzymes, genes and regulation mechanisms in biosynthesis pathway of stilbenes. *Open J. Med. Chem.* **2012**, *2*, 15–23. [[CrossRef](#)]
14. Donnez, D.; Jeandet, P.; Clément, C.; Courot, E. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 706–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Delaunois, B.; Cordelier, S.; Conreux, A.; Clément, C.; Jeandet, P. Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol. J.* **2009**, *7*, 2–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Jeandet, P.; Delaunois, B.; Aziz, A.; Donnez, D.; Vasserot, Y.; Cordelier, S.; Courot, E. Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene resveratrol. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 579089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Jeandet, P.; Clément, C.; Courot, E.; Cordelier, S. Modulation of phytoalexin biosynthesis in engineered plants for disease resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 14136–14170. [[PubMed](#)]
18. Jeandet, P.; Clément, C.; Courot, E. Resveratrol production at large scale using plant cell suspensions. *Eng. Life Sci.* **2014**, *14*, 622–632. [[CrossRef](#)]
19. Jeandet, P.; Clément, C.; Tisserant, L.P.; Crouzet, J.; Courot, E. Use of grapevine cell cultures for the production of phytoalexins of cosmetic interest. *C. R. Chim.* **2016**, *19*, 1062–1070.
20. Georgiev, M.I.; Pavlov, A.I.; Bley, T. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 1175–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Giri, A.; Narasu, M.L. Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18*, 1–22. [[CrossRef](#)]
22. Yang, T.; Fang, L.; Nopo-Olazabal, C.; Condori, J.; Nopo-Olazabal, L.; Balmaceda, C.; Medina-Bolivar, F. Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with methyl jasmonate and cyclodextrin. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 3942–3950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Medina-Bolivar, F.; Condori, J.; Rimando, A.M.; Hubstenberger, J.; Shelton, K.; O’Keefe, S.F.; Bennett, S.; Dolan, M.C. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1992–2003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nopo-Olazabal, C.; Hubstenberger, J.; Nopo-Olazabal, L.; Medina-Bolivar, F. Antioxidant activity of selected stilbenoids and their bioproduction in hairy root cultures of Muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.). *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11744–11758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Parage, C.; Tavares, R.; Réty, S.; Baltenweck-Guyot, R.; Poutaraud, A.; Renault, L.; Heintz, D.; Lugan, R.; Marais, G.A.B.; Aubourg, S.; et al. Structural, functional and evolutionary analysis of the unusually large stilbene synthase gene family in grapevine. *Plant Physiol.* **2012**, *160*, 1407–1419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Pawlus, A.D.; Sahli, R.; Bisson, J.; Rivière, C.; Delaunay, J.C.; Richard, T.; Gomès, E.; Bordenave, L.; Waffo-Tégou, P.; Mérillon, J.M. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 501–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lambert, C.; Richard, T.; Renouf, E.; Bisson, J.; Waffo-Tégou, P.; Bordenave, L.; Ollat, N.; Mérillon, J.M.; Cluzet, S. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11392–11399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jeandet, P.; Bessis, R.; Gautheron, B. The production of resveratrol (3,5,4’-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 41–46.
29. Jittayasothorn, Y.; Yang, Y.; Chen, S.; Wang, X.; Zhong, Y. Influences of *Agrobacterium rhizogenes* strains, plant genotypes, and tissue types on the induction of transgenic hairy roots in *Vitis* species. *Vitis* **2011**, *50*, 107–114.
30. Jaillon, O.; Aury, J.M.; Noel, B.; Policriti, A.; Clepet, C.; Casagrande, A.; Choisne, N.; Aubourg, S.; Vitulo, N.; Jubin, C.; et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **2007**, *449*, 463–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Sangwan, R.S.; Bourgeois, Y.; Brown, S.; Vasseur, G.; Sangwan-Norreel, B. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **1992**, *188*, 439–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Krens, F.A.; Trifonova, A.; Keizer, L.C.P.; Hall, R.D. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Sci.* **1996**, *116*, 97–106. [[CrossRef](#)]
33. Do, C.B.; Cormier, F. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Rep.* **1990**, *9*, 143–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Wang, W.; Tang, K.; Yang, H.R.; Wen, P.F.; Zhang, P.; Wang, H.L.; Huang, W.D. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, *48*, 142–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Almagro, L.; Belchí-Navarro, S.; Sabater-Jara, A.B.; Vera-Urbina, J.C.; Selles-Marchart, S.; Bru, R.; Pedreno, M.A. *Handbook of Natural Products*; Ramawat, K.G., Merillon, J.M., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2013; pp. 1683–1713.

36. Namdeo, A.G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacogn. Rev.* **2007**, *1*, 69–79.
37. Ramachandra Rao, S.; Ravishankar, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 101–153. [[CrossRef](#)]
38. Belhadj, A.; Telef, N.; Saigne, C.; Cluzet, S.; Barrieu, F.; Hamdi, S.; Mérillon, J.M. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, *46*, 493–499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Donnez, D.; Kim, K.H.; Antoine, S.; Conreux, A.; de Luca, V.; Jeandet, P.; Clément, C.; Courot, E. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1056–1062. [[CrossRef](#)]
40. Krisa, S.; Larronde, F.; Budzinski, H.; Decendit, A.; Deffieux, G.; Mérillon, J.M. Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Methyl jasmonate induction and <sup>13</sup>C biolabeling. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1688–1690. [[CrossRef](#)]
41. Martínez-Esteso, M.J.; Sellés-Marchart, S.; Vera-Urbina, J.C.; Pedreño, M.A.; Bru-Martinez, R. Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv Gamay) cell cultures in response to elicitors. *J. Proteom.* **2009**, *73*, 331–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Santamaria, A.R.; Mulinacci, N.; Valletta, A.; Innocenti, M.; Pasqua, G. Effects of elicitors on the production of resveratrol and viniferins in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cv Italia. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 9094–9101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Santamaria, A.R.; Innocenti, M.; Mulinacci, N.; Melani, F.; Valletta, A.; Sciandra, I.; Pasqua, G. Enhancement of viniferin production in *Vitis vinifera* L. cv. Alphonse Lavallée cell suspensions by low-energy ultrasound alone and in combination with methyl jasmonate. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11135–11142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tassoni, A.; Fornalè, S.; Franceschetti, M.; Musiani, F.; Michael, A.J.; Perry, B.; Bagni, N. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytol.* **2005**, *166*, 895–905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Xu, A.; Zhan, J.C.; Huang, W.D. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid alone or in combination on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2015**, *122*, 197–211. [[CrossRef](#)]
46. Yue, X.; Zhang, W.; Deng, M. Hyper-production of <sup>13</sup>C-labeled trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cell culture by elicitation and in situ adsorption. *Biochem. Eng. J.* **2011**, *53*, 292–296. [[CrossRef](#)]
47. Santamaria, A.R.; Antonacci, D.; Caruso, G.; Cavaliere, C.; Gubbiotti, R.; Laganà, A.; Valletta, A.; Pasqua, G. Stilbene production in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cvs Globe and Michele Palieri elicited by methyl jasmonate. *Nat. Prod. Res.* **2010**, *24*, 1488–1498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kastell, A.; Smetanska, I.; Ulrichs, C.; Cai, Z.; Mewis, I. Effects of phytohormones and jasmonic acid on glucosinolate content in hairy root cultures of *Sinapis alba* and *Brassica rapa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2013**, *169*, 624–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Bru, R.; Sellés, S.; Casado-Vela, J.; Belchí-Navarro, S.; Pedreño, M.A. Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Almagro, L.; Belchí-Navarro, S.; Martínez-Márquez, A.; Bru, R.; Pedreño, M.A. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and coronatine. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, *97*, 361–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Belchí-Navarro, S.; Almagro, L.; Lijavetzky, D.; Bru, R.; Pedreño, M.A. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Cell Rep.* **2012**, *31*, 81–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lijavetzky, D.; Almagro, L.; Belchí-Navarro, S.; Martínez-Zapater, J.M.; Bru, R.; Pedreño, M.A. Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. *BMC Res. Notes* **2008**, *1*, 132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Vera-Urbina, J.C.; Selles-Marchart, S.; Martínez-Esteso, M.J.; Pedreño, M.A.; Bru-Martinez, R. *Resveratrol: Source Production and Health Benefits*; Delmas, D., Ed.; Nova Science Publishers Inc.: New York, NY, USA, 2013; pp. 19–40.

54. Zamboni, A.; Vrhovsek, U.; Kassemeyer, H.H.; Mattivi, F.; Velasco, R. Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). *Vitis* **2006**, *45*, 63–68.
55. Belchí-Navarro, S.; Almagro, L.; Sabater-Jara, A.B.; Fernández-Pérez, F.; Bru, R.; Pedreño, M.A. Induction of trans-resveratrol and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited suspension cultured cells of *Vitis vinifera* cv Monastrell. *J. Plant Physiol.* **2013**, *170*, 258–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Repka, V.; Fischerová, I.; Šilhárová, K. Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biol. Plant.* **2004**, *48*, 273–283. [[CrossRef](#)]
57. Marsh, Z.; Yang, T.; Nopo-Olazabal, L.; Wu, S.; Ingle, T.; Joshee, N.; Medina-Bolivar, F. Effect of light, methyl jasmonate and cyclodextrin on production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora*. *Phytochemistry* **2014**, *107*, 50–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Silva, F.; Figueiras, A.; Gallardo, E.; Nerín, C.; Domingues, F.C. Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: A comparative study between cyclodextrins and bile acids. *Food Chem.* **2014**, *145*, 115–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Bru-Martinez, R.; Pedreno, M.A. Method for the Production of Resveratrol in Cell Cultures. U.S. Patent 20060205049 A1, 14 September 2006.
60. Hooykaas, P.J.J.; Klapwijk, P.M.; Nuti, M.P.; Schilperoort, R.A.; Rörsch, A. Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* TI plasmid to avirulent *Agrobacteria* and to *Rhizobium ex planta*. *Microbiology* **1977**, *98*, 477–484. [[CrossRef](#)]
61. Gamborg, O.L.; Miller, R.A.; Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **1968**, *50*, 151–158. [[CrossRef](#)]
62. Ruslan, K.; Selfitri, A.D.; Bulan, S.A.; Rukayadi, Y.; Elfahmi, T. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* and elicitation on the asiaticoside production in cell cultures of *Centella asiatica*. *Pharmacogn. Mag.* **2012**, *8*, 111–115. [[PubMed](#)]
63. Yang, D.C.; Choi, Y.E. Production of transgenic plants via *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep.* **2000**, *19*, 491–496. [[CrossRef](#)]
64. Huet, Y.; Ekouna, J.P.E.; Caron, A.; Mezreb, K.; Boitel-Conti, M.; Guérineau, F. Production and secretion of a heterologous protein by turnip hairy roots with superiority over tobacco hairy roots. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *36*, 181–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, *15*, 473–497. [[CrossRef](#)]
66. Lloyd, G.; McCown, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Propag. Soc. USA* **1980**, *30*, 421–426.
67. Schenk, R.U.; Hildebrandt, A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* **1972**, *50*, 199–204. [[CrossRef](#)]
68. Mairet, F.; Sierra, J.; Glorian, V.; Villon, P.; Shakourzadeh, K.; Boitel-Conti, M. A new approach to define optimized range of medium composition for enhancement of hairy root production in fed-batch process. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *3*, 2257–2265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Gruau, C.; Trotel-Aziz, P.; Villaume, S.; Rabenoelina, F.; Clément, C.; Baillieul, F.; Aziz, A. *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 triggers local and systemic immune response against *Botrytis cinerea* in grapevine. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2015**, *28*, 1117–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Hatmi, S.; Trotel-Aziz, P.; Villaume, S.; Couderchet, M.; Clément, C.; Aziz, A. Osmotic stress-induced polyamine oxidation mediates defence responses and reduces stress-enhanced grapevine susceptibility to *Botrytis cinerea*. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 75–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Aziz, A.; Trotel-Aziz, P.; Dhucq, L.; Jeandet, P.; Couderchet, M.; Vernet, G. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology* **2006**, *96*, 1188–1194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Verhagen, B.; Trotel-Aziz, P.; Jeandet, P.; Baillieul, F.; Aziz, A. Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin production. *Phytopathology* **2011**, *101*, 768–777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Tisserant, L.P.; Hubert, J.; Lequart, M.; Borie, N.; Maurin, N.; Pilard, S.; Jeandet, P.; Aziz, A.; Renault, J.H.; Nuzillard, J.M.; et al. <sup>13</sup>C RNM and LC-MS Chemical profiling of major stilbenes of pharmaceutical significance produced by elicited *Vitis vinifera* cv. Pinot noir hairy root cultures. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 2846–2855. [[CrossRef](#)]

74. Georgiev, M.I.; Agostini, E.; Ludwig-Müller, J.; Xu, J. Genetically transformed roots: From plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 528–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Sivakumar, G.; Yu, K.W.; Paek, K.Y. Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Eng. Life Sci.* **2005**, *5*, 333–342. [[CrossRef](#)]

**Sample Availability:** Not available.



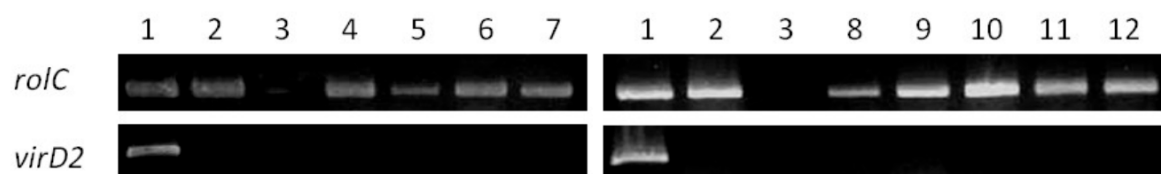
© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Supplementary Materials: Enhanced Stilbene Production and Excretion in *Vitis vinifera* cv Pinot Noir Hairy Root Cultures

Leo-Paul Tisserant, Aziz Aziz, Nathalie Jullian, Philippe Jeandet, Christophe Clément, Eric Courrot and Michèle Boitel-Conti

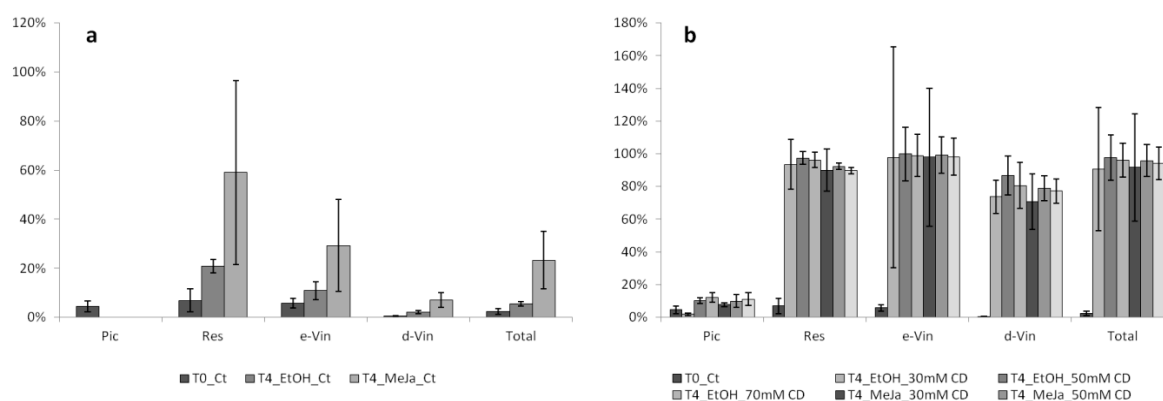
## 1. Confirmation of the Transformation

The transformation of the selected hairy root lines was done by verification of the presence of the auxin-synthesis coding *rolC* gene and the absence of the virulence *virD2* bacterial gene. As shown in Figure S1; all 9 selected lines were confirmed to be transformed.



**Figure S1.** PCR confirmation of the transformation. (1) *R. rhizogenes* ATCC 15834 double positive control; (2) *Brassica rapa* hairy roots as a *rolC* positive control; (3) *Vitis vinifera* in vitro plantlet roots as double negative control. (4) Root line 19A; (5): Root line 16C; (6) Root line 18B; (7) Root line 13F; (8) Root line 19B; (9) Root line 16D; (10) Root line 3A; (11) Root line 13G; (12): Root line 28C.

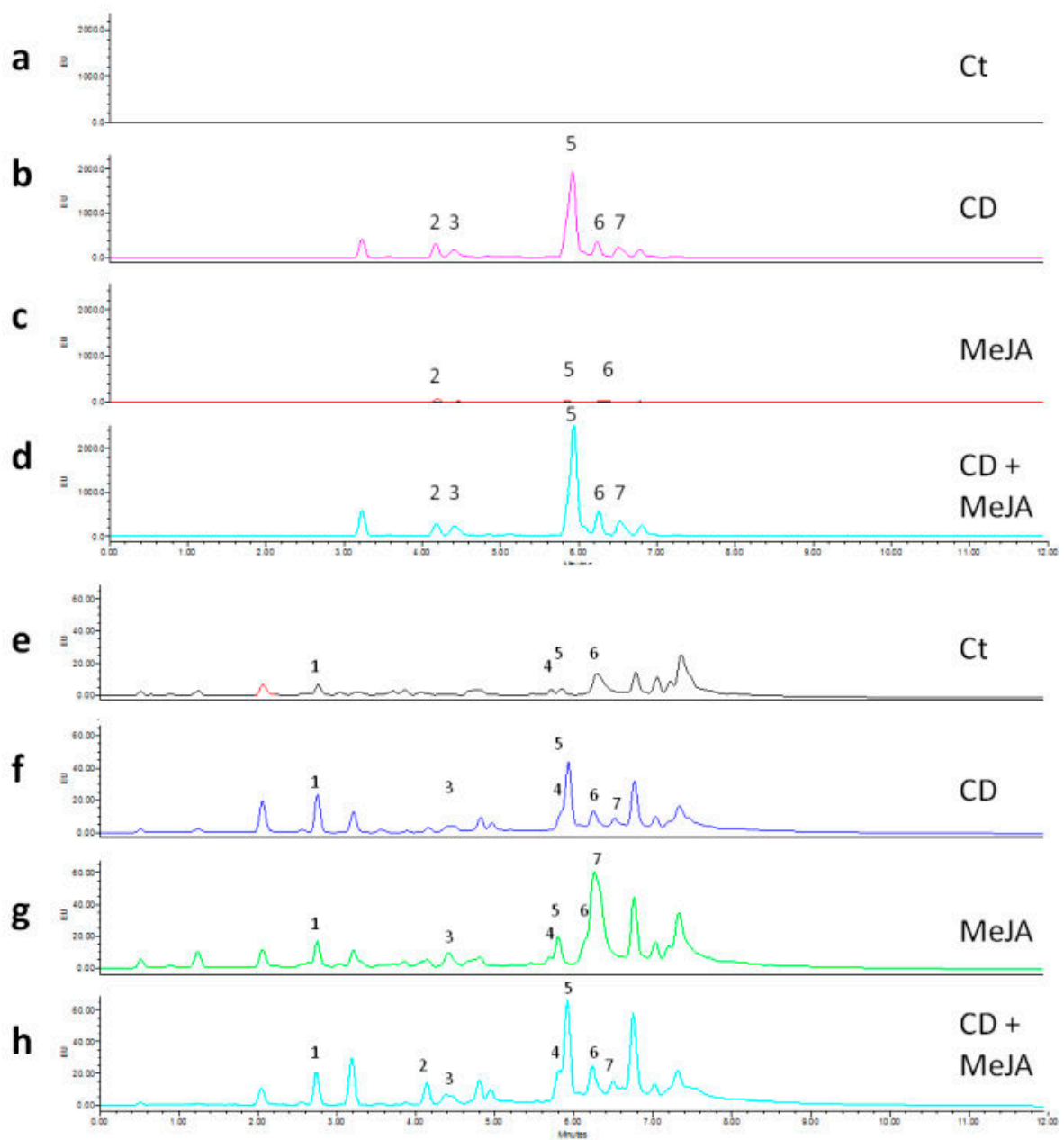
## 2. Proportion of Different Excreted Stilbenes



**Figure S2.** Proportion of each stilbene excreted in the culture medium over the sum of their intracellular and excreted amounts.

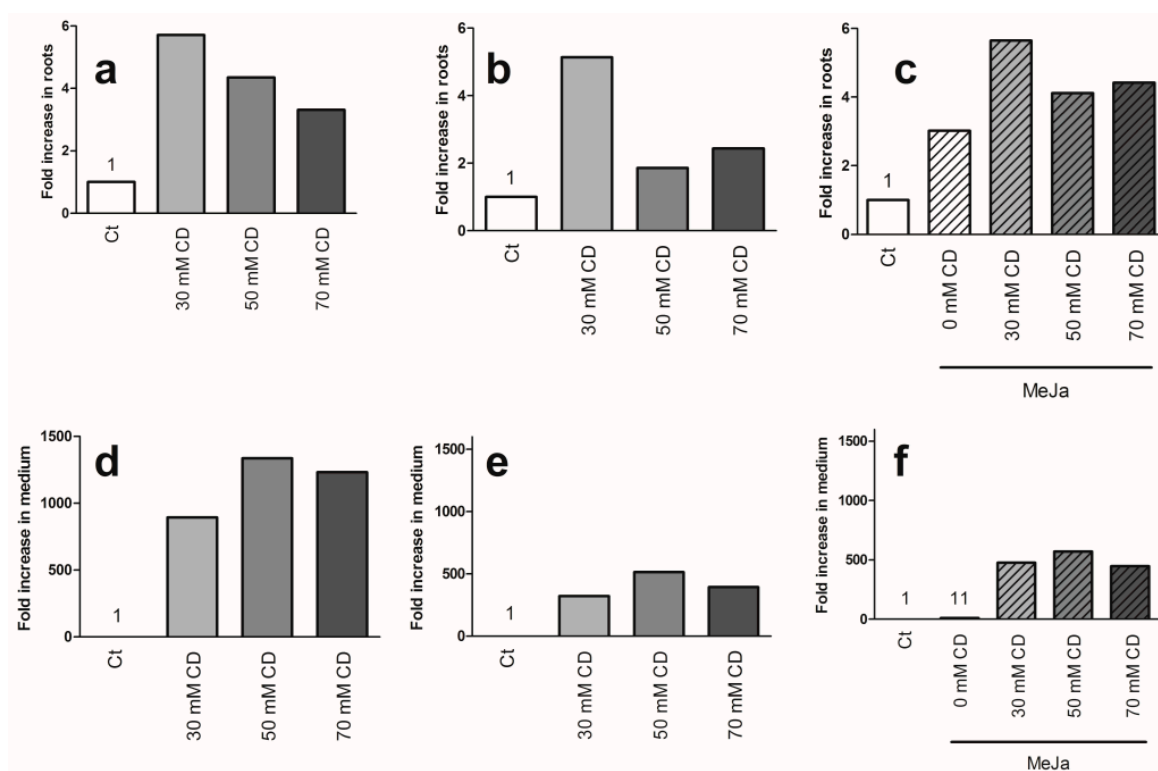


### 3. UPLC Chromatograms



**Figure S3.** Examples of UPLC chromatograms for culture medium extracts (**a–d**) and root extracts 96 h after elicitation (**d–h**); for controls; 50 mM MCD; 100 μM MeJA; and 100 μM MeJA in combination with 50 mM MCD respectively. 1: t-piceid; 2: t-resveratrol; 3: c-resveratrol; 4: c-ε-viniferin; 5: t-ε-viniferin; 6: t-δ-viniferin; 7: c-δ-viniferin.

#### 4. Fold-Increase in Stilbene Production in Comparison to Controls



**Figure S4.** Relative amounts of total stilbenes quantified for each treatment in comparison to control. MCD concentrations tested were 0; 30; 50 and 70 mM. (a–c) Fold-increase in production of stilbenes in roots in comparison to control before induction; after 4 days without MeJA and after 4 days with 100 μM MeJA respectively; (d–f) Fold-increase in production of stilbenes in the culture medium in comparison to control before induction; after 4 days without MeJA and after 4 days with 100 μM MeJA respectively.



## 2<sup>ème</sup> Article : Profilage phytochimique des HRs

---

Le resvératrol et ses dérivés sont des molécules de défense produites par la vigne en réponse à différents éliciteurs ou molécules signal. Outre leur rôle capital *in planta*, ils font l'objet d'une attention toute particulière du fait de leurs propriétés pharmaceutiques. La production efficace de resvératrol et de ses dérivés plus complexes tels que ses oligomères reste toutefois difficile. Dans cet article, la diversité chimique des stilbènes produits par des racines transformées de *Vitis vinifera* cv. Pinot noir a été étudiée après 4 jours de traitement avec 100 µM de MeJA et 50 mM de CDs. Les extraits bruts de milieu de culture et de racines ont été fractionnés par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), pour obtenir des fractions de 20 ml contenant des mélanges moins complexes de molécules. Ces fractions ont ensuite été rassemblées en fonction de leur profil en Chromatographie en Couche Mince (CCM) pour donner 22 et 17 échantillons pour le milieu de culture et les racines respectivement.

Les fractions ainsi obtenues ont été caractérisées par deux méthodes complémentaires, la première utilisant une approche récemment développée de déréplication par RMN <sup>13</sup>C, ensuite confirmée par une méthode de chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS). L'analyse des fractions de chaque échantillon a permis d'obtenir l'ensemble des déplacements chimiques mesurés en RMN C<sup>13</sup>, qui ont été tous deux soumis à un traitement d'Analyse de Clustering Hiérarchique. Ce traitement a permis de faire apparaître un certain nombre de clusters dont l'ensemble des déplacements chimiques ont été comparés à une base de données de stilbènes.

Ceci a mis en évidence la présence de *t*-resvératrol et de -viniférine majoritairement dans l'extrait de milieu de culture des racines mais aussi d'identifier le *trans*-picéatannol, le pallidol, la scirpusine A, l'ériodictyol, la naringenine et le méthyl jasmonate. La présence d'un autre dimère, la maakine a aussi pu être mise en évidence en recherchant spécifiquement ses déplacements chimiques et en croisant ces données avec celles de LC-MS. Dans l'extrait de racines, les principaux stilbènes retrouvés sont le *t*-resvératrol, l' -viniférine, le *trans*-picéatannol et le pallidol. Les autres molécules identifiées dans le milieu de culture étaient l'ériodictyol et un tétramère de resvératrol, la vitisine B.

Les analyses par LC-MS ont permis de mettre en évidence la présence d'un grand nombre d'autres stilbènes présents à des concentrations ne permettant pas leur identification



en RMN et dont la LC-MS ne permet pas de déterminer la structure exacte, notamment des dimères et trimères avec des ions moléculaires de m/z 455 et m/z 681 respectivement, dans l'extrait du milieu de culture des racines et dans les racines. Au total, des groupes de 21 ou 18 molécules incluant des flavonoïdes et des stilbènes ont été détectés dans les extraits de milieu de culture et de racines respectivement. La présence de trimères de resvératrol dans les racines et leur absence dans le milieu de culture suppose une synthèse intratissulaire de ces composés. Toutefois, il est important de noter que la méthode d'échantillonnage et d'analyse choisies ne permettent pas la différenciation des stilbènes intracellulaires, intratissulaires ni de ceux présents au niveau des parois des cellules. Ces trois compartiments sont ici quantifiés ensemble et considérés comme formant le contenu racinaire en stilbènes.

En termes de production spécifique, les racines étudiées ont montré une production spécifique de 13,3 mg/g MF de stilbènes, équivalents aux 13,4 mg/g MF produits au maximum par les cellules de vigne en suspension. Par contre le fait que la biomasse de racines utilisée soit extrêmement faible, avec 6,6 g MF/l de milieu en comparaison aux biomasses de cellules de vigne en suspension correspondantes, atteignant 500 g MF/l de milieu impose un important travail d'optimisation de la croissance racinaire. Néanmoins la capacité des racines transformées à synthétiser une plus grande variété de stilbènes soutiennent la pertinence de ce système pour l'étude du métabolisme et pour la bioproduction de stilbènes encore difficilement accessibles avec d'autres moyens de production.

L'article décrivant ces résultats s'intitule "**<sup>13</sup>C NMR and LC-MS Profiling of Stilbenes from Elicited Grapevine Hairy Root Cultures**"

*Article publié dans Journal of Natural Products.*



## <sup>13</sup>C NMR and LC-MS Profiling of Stilbenes from Elicited Grapevine Hairy Root Cultures

Leo-Paul Tisserant,<sup>†,§</sup> Jane Hubert,<sup>‡</sup> Michelle Lequart,<sup>§</sup> Nicolas Borie,<sup>‡</sup> Nicolas Maurin,<sup>‡</sup> Serge Pilard,<sup>⊥</sup> Philippe Jeandet,<sup>†</sup> Aziz Aziz,<sup>†</sup> Jean-Hugues Renault,<sup>‡</sup> Jean-Marc Nuzillard,<sup>‡</sup> Christophe Clément,<sup>†</sup> Michèle Boitel-Conti,<sup>§</sup> and Eric Courot<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne EA 4707, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

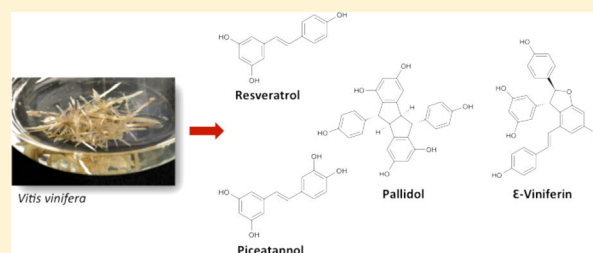
<sup>‡</sup>Institut de Chimie Moléculaire de Reims UMR CNRS 7312, SFR Cap 'Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

<sup>§</sup>Laboratoire de Biologie des Plantes & Innovation EA 3900, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Picardie Jules Verne, UFR de Sciences, Ilot des Poulies, 33 Rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France

<sup>⊥</sup>Plateforme Analytique, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Picardie Jules Verne, UFR des Sciences, Bâtiment Serres-Transfert Rue Dallery–Passage du Sourire d'Avril, 80039 Amiens Cedex 1, France

### S Supporting Information

**ABSTRACT:** Resveratrol and related oligostilbenes are defense molecules produced by grapevine in response to stresses including various elicitors or signal molecules. Together with their prominent role *in planta*, these compounds have been the center of much attention in recent decades due to their pharmacological properties. The cost-effective production of resveratrol derivatives such as viniferins or more structurally complex stilbene oligomers remains a challenging task. In this study, the chemical diversity of stilbenes produced by *Vitis vinifera* Pinot Noir hairy roots was investigated after elicitation for 4 days with a mixture of methyl jasmonate (100 μM) and cyclodextrins (50 mM). Two crude extracts obtained from the culture medium and from the hairy roots were fractionated by centrifugal partition chromatography. The fractions were chemically investigated by two complementary identification approaches involving a <sup>13</sup>C NMR-based dereplication method and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). In total, groups of 21 and 18 molecules, including flavonoids and stilbenes, were detected in the culture medium and root extracts, respectively. These included resveratrol monomers, dimers, trimers, and a tetramer, thus highlighting the ability of elicited hairy root culture systems to synthesize a wide diversity of secondary metabolites of pharmaceutical significance. The main compounds were unambiguously identified as *trans*-resveratrol, *ε*-viniferin, *trans*-piceatannol, pallidol, scirpusin A, eriodictyol, naringenin, vitisin B, and maackin.



Natural stilbenes are plant defense molecules displaying a wide range of biological activities. Among this chemical class of secondary metabolites, resveratrol remains by far the most studied stilbene due to its relatively high abundance, which makes it easy to purify and purchase at a reasonable cost. Resveratrol can naturally undergo transformations such as glycosylation, hydroxylation, *O*-methylation, and oligomerization to yield a variety of dimer, trimer, or tetramer derivatives.<sup>1–3</sup> This resulting molecular diversity can be observed in various species belonging for instance to the genus *Vitis*, *Pinus*, *Arachis*, or *Picea*.<sup>4,5</sup> Most of the biological activities reported for stilbenes have been attributed to resveratrol itself, mainly because studying the oligomers is hampered by their limited supply and typically does not include *in vivo* or clinical data. Yet, a number of studies relying on *in vitro* models have brought to the fore the biological potential of stilbene oligomers, making them also potential candidates for

the development of drugs or cosmetic ingredients. For example, several resveratrol dimers and hexamers isolated from the stem of *Vatica albiramis* have been reported as strong inhibitors of matrix metalloproteinases (MMP-1) production.<sup>1</sup> Other trimers and tetramers from the *Hopea* genus have demonstrated a significant activity against *Herpes simplex* virus on infected cell lines.<sup>2</sup> Among the so-called “viniferins”, the anti-inflammatory activity of *α*-viniferin demonstrated in carrageenan-induced paw edema or on adjuvant-induced arthritis in animal models is noteworthy.<sup>3,4</sup> Many other effects including antioxidant, antidiabetic, antiviral, antimicrobial, anti-Alzheimer’s disease, cytotoxic, and anticancer activities have been reported for stilbene oligomers and summarized in recent reviews.<sup>5,6</sup> Of course, because most studies were limited only to *in vitro*

Received: July 1, 2016

Published: November 14, 2016

models, these data must be considered with caution. It is also important to remember that certain natural products, particularly those carrying a phenolic moiety, may interfere with bioassays via a number of different mechanisms. Therefore, the biological readout is an important factor, and these compounds designed as pan-assay interference compounds (PAINS) must be taken into account when addressing the biological potential of active molecules.<sup>7,8</sup>

In this context, the cost-effective production of resveratrol oligomers has become an important challenge to obtain sufficient material for systematic pharmacological studies. The natural abundance of stilbene oligomers in *Vitis* spp. remains low, making it difficult to purify these closely related compounds individually from crude natural mixtures. Until now, resveratrol has mainly been produced by extraction of piceid (3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl resveratrol) from *Fallopia japonica* roots before its conversion into resveratrol by simple deglycosylation. Other resveratrol derivatives, such as the dimers  $\epsilon$ -viniferin and  $\delta$ -viniferin, are usually found as mixtures in complex extracts for cosmetic or nutraceutical uses, but their individual production does not meet the standards of the pharmaceutical industry in terms of cost, yield, and purity. As the production of stilbene oligomers is also difficult to achieve via chemical synthesis, alternative solutions have been proposed during recent years. The use of biotechnological systems, such as genetically engineered bacteria or yeasts, or nonrecombinant grapevine cell suspensions could represent powerful methods for the large-scale production of stilbenes.<sup>9,10</sup> Such systems are promising in terms of culture conditions and production, but are hampered by a lack of reproducibility due to incomplete knowledge about the biosynthesis of resveratrol derivatives and their regulation networks. The use of dedifferentiated grapevine cell suspensions enables an effective production of resveratrol and, to a lesser extent, viniferins through cell excretion directly into the culture medium,<sup>22</sup> but so far the variety of the stilbene derivatives produced by this method has remained limited.<sup>11</sup>

Hairy roots have been proposed as an alternative to produce resveratrol derivatives. These cultures can be obtained by the transformation of a plant infected with *Agrobacterium rhizogenes*<sup>12</sup> (renamed *Rhizobacterium rhizogenes*<sup>13</sup>). Such systems do not require the addition of phytohormones in the culture medium to maintain growth, possess a high growth rate, and display high genetic and phytochemical stability.<sup>14,15</sup> Upscaling of hairy root cultures has proved feasible.<sup>16</sup> For instance, hairy roots of peanut (*Arachis hypogaea*) producing resveratrol and pterostilbene have been developed by Medina-Bolivar et al.<sup>17</sup> as well as those of muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) producing piceid, piceatannol, resveratrol, and  $\epsilon$ -viniferin.<sup>18</sup>

As naturally occurring *Vitis* species contain significant amounts of resveratrol and its dimers, it was expected that the use of *Vitis*-derived hairy roots under elicitation would result in the production of interesting profiles of stilbene derivatives. Hairy root cultures were elicited with a mixture of methyl jasmonate (MeJA), a plant hormone directly involved in defense reactions,<sup>19,20</sup> and methyl- $\beta$ -cyclodextrins (CDs), drug transporters able to stabilize resveratrol in the culture medium<sup>21</sup> as well as to elicit its production by grapevine cell suspensions.<sup>11,22</sup> Such a mixture of elicitors has been reported to exert a synergistic effect on the induction of stilbene production.<sup>23–25</sup> The molecular structures of the different stilbenes produced were determined after fractionation of the hairy root and culture medium extracts by centrifugal partition

chromatography (CPC) followed by NMR and LC-MS dereplication.

## RESULTS AND DISCUSSION

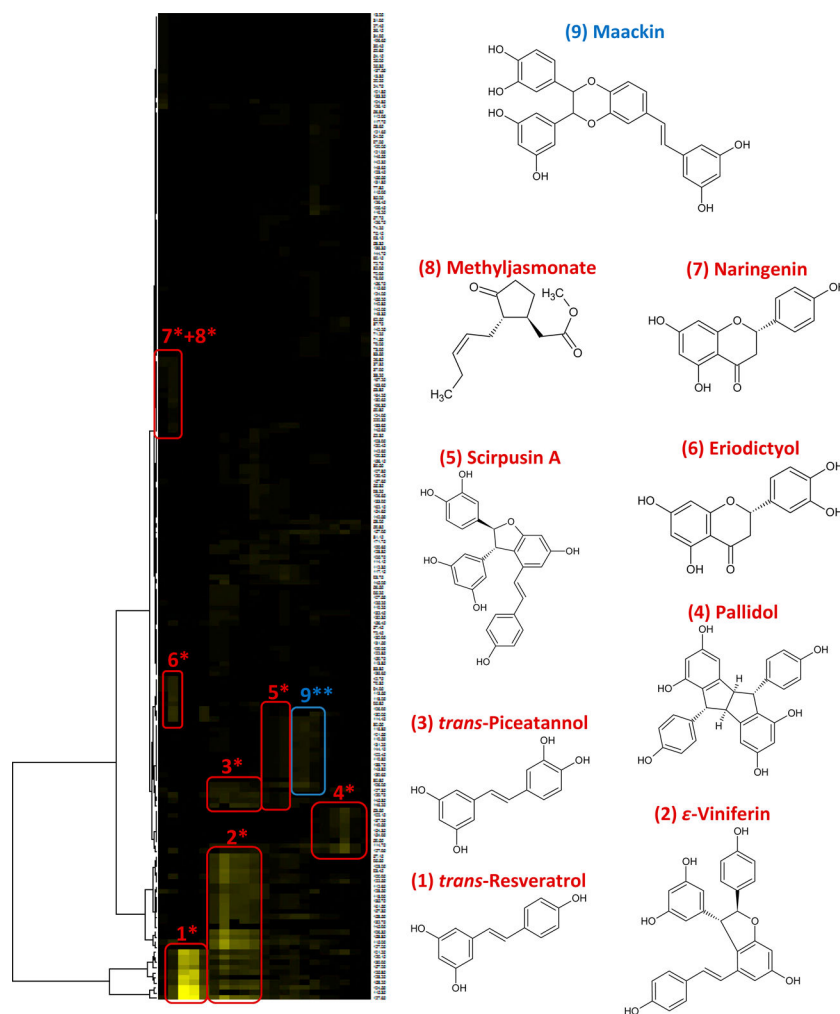
**Hairy Root Cultures.** Hairy roots were cultivated for 40 days after inoculation in order to obtain a sufficient quantity of

**Table 1. Mass and Composition of the CPC Fractions Obtained from Experiments A and B**

experiment A, culture medium			experiment B, hairy roots		
fraction no.	mass (mg)	% of extract (w/w)	fraction no.	mass (mg)	% of extract (w/w)
F1 <sub>A</sub>	3.9	0.2	F <sub>B</sub>	24	0.6
F2 <sub>A</sub>	8.4	0.4	F2 <sub>B</sub>	15.1	0.4
F3 <sub>A</sub>	129.3	5.9	F3 <sub>B</sub>	8.5	0.2
F4 <sub>A</sub>	146.1	6.6	F4 <sub>B</sub>	2.9	0.1
F5 <sub>A</sub>	5.1	0.2	F5 <sub>B</sub>	1.9	0.1
F6 <sub>A</sub>	12.2	0.6	F6 <sub>B</sub>	3.5	0.1
F7 <sub>A</sub>	26.9	1.2	F7 <sub>B</sub>	6.1	0.2
F8 <sub>A</sub>	13.0	0.6	F8 <sub>B</sub>	42.1	1.1
F9 <sub>A</sub>	16.3	0.7	F9 <sub>B</sub>	2.0	0.1
F10 <sub>A</sub>	31.9	1.5	F10 <sub>B</sub>	9.8	0.3
F11 <sub>A</sub>	3	0.1	F11 <sub>B</sub>	15.7	0.4
F12 <sub>A</sub>	5.5	0.3	F12 <sub>B</sub>	11.6	0.3
F13 <sub>A</sub>	25.9	1.2	F13 <sub>B</sub>	4.9	0.1
F14 <sub>A</sub>	20.3	0.9	F14 <sub>B</sub>	2.1	0.1
F15 <sub>A</sub>	19.6	0.9	F15 <sub>B</sub>	6.6	0.2
F16 <sub>A</sub>	17.8	0.8	F16 <sub>B</sub>	6.1	0.2
F17 <sub>A</sub>	8.7	0.4	extrusion	3465	93.6
F18 <sub>A</sub>	9.9	0.5			
F19 <sub>A</sub>	5.6	0.3			
F20 <sub>A</sub>	8	0.4			
F21 <sub>A</sub>	7.5	0.3			
extrusion	1542	70.1			

biomass. Each flask contained an average of 6.5 g fresh weight (FW) at the time of elicitation. After adding the mixture of elicitors (CDs + MeJA), the roots gradually changed from white to dark brown in color and the culture medium changed from colorless to dark orange, suggesting a strong stress coupled with the production of polyphenols.<sup>26</sup> As elicitation with CDs and MeJA can compromise root viability if applied for too long a period, the treatment was maintained for 96 h, allowing high stilbene production with no consequences on cell viability.

**CPC Fractionation of Crude Stilbene Extracts from Hairy Roots and Culture Medium.** Two independent centrifugal partition chromatography experiments were performed to fractionate the crude EtOAc extracts obtained from the culture medium (extract A) or from the hairy roots (extract B). A gradient elution method was used with two sets of biphasic solvent systems composed of *n*-heptane, EtOAc, MeOH, and H<sub>2</sub>O and belonging to the so-called “Arizona” or HEMW at solvent systems.<sup>27</sup> These solvent systems have been successfully used for the purification of stilbene oligomers from *V. vinifera*.<sup>28</sup> In the present work, the gradient was optimized between the two Arizona solvent systems *n*-heptane/EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O 5/6/5/6 (v/v) and 2/5/2/5 (v/v) in an attempt to fractionate the maximum number of stilbenes in a single run per extract and to maintain a good hydrodynamic stability between the liquid phases inside the column with a reasonable separation time. After injection and column equilibration, the



**Figure 1.**  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift clusters obtained by applying HCA on the CPC fractions of extract A. \*Stilbenes identified by dereplication. \*\*Stilbenes identified by scrutinizing 1D and 2D NMR spectra and by LC-MS analyses.

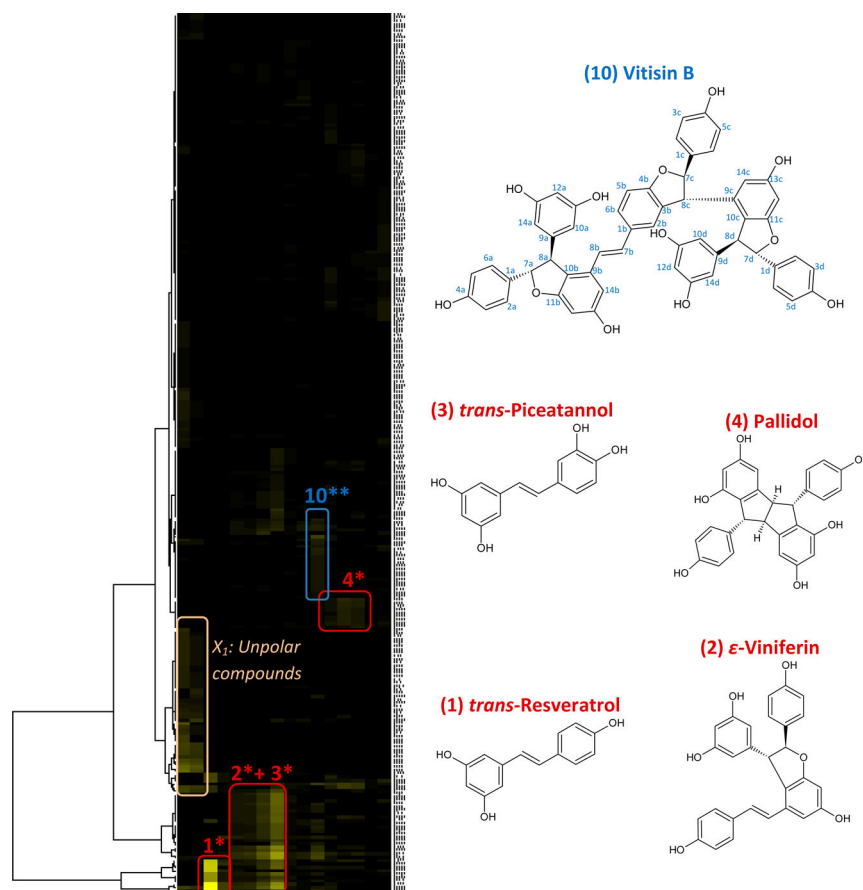
initial stationary phase retention values were ca. 65% for both experiments and the final retentions were higher than 50%, indicating a quite good solvent system stability despite significant changes in the mobile phase composition during the gradient.

After pooling the CPC fractions according to their TLC profile, 21 subfractions were obtained for extract A (culture medium) and 16 for extract B (hairy roots). As indicated in Table 1, the total mass recovered from extract A ( $F_{1A}$  to  $F_{21A}$ ) represented 24% of the injected mass, while 71% of the crude extract mass was retained inside the column over the whole experiment (total recovery ca. 95%). For extract B, the total mass recovered during the mobile phase gradient ( $F_{1B}$  to  $F_{16B}$ ) represented 5% of the injected mass, while 94% of the crude extract compounds—the most hydrophilic ones—were retained inside the column (total recovery ca. 99%). The  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the stationary phase extruded from the CPC column at the end of each experiment revealed intense NMR sugar signals between 55 and 110 ppm and the absence of aromatic signals (Figure S1, Supporting Information), thus confirming that no more stilbene oligomers were retained inside the CPC column at the end of the gradient elution procedure. These remaining compounds corresponded to the CDs and sucrose present in the culture medium as well as

glucose and fructose arising from the degradation of sucrose by roots and root endogenous sugars.

**NMR and LC-MS Dereplication of the Produced Stilbenes.** All CPC fractions ( $F_{1A}$  to  $F_{21A}$  and  $F_{1B}$  to  $F_{16B}$ ) were first analyzed by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. Automatic peak picking and alignment of  $^{13}\text{C}$  NMR signals across spectra of each fraction series resulted in a table with 21 columns (one per fraction) and 195 rows (one per chemical shift bin containing at least one  $^{13}\text{C}$  NMR signal in at least one fraction) for extract A and in a table with 16 columns and 263 rows for extract B. Both tables were independently submitted to hierarchical clustering analysis (HCA) on the rows. As a result, statistical correlations between  $^{13}\text{C}$  NMR resonances belonging to a single structure within the fraction series were visualized as “chemical shift clusters” in front of the corresponding dendrograms. The HCA correlation maps obtained for extracts A and B are presented in Figures 1 and 2, respectively. For metabolite identification, both  $^{13}\text{C}$  NMR and LC/MS data were cross-checked and subsequently confirmed by 2D NMR analyses. In order to evaluate the consistency of the identification process, metabolites were also annotated according to Metabolomics Standards Initiative (MSI) recommendations.<sup>29</sup> As a result, metabolites with the annotation level 2 correspond to the molecular structures identified by comparing their NMR and LC-MS data





**Figure 2.**  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift clusters obtained by applying HCA on the CPC fractions of extract B. \*Stilbenes identified by dereplication. \*\*Stilbenes identified by scrutinizing 1D and 2D NMR spectra. \*\*\*Chemical shift clusters of major metabolites that are not stilbenes or phenolic molecular structures.

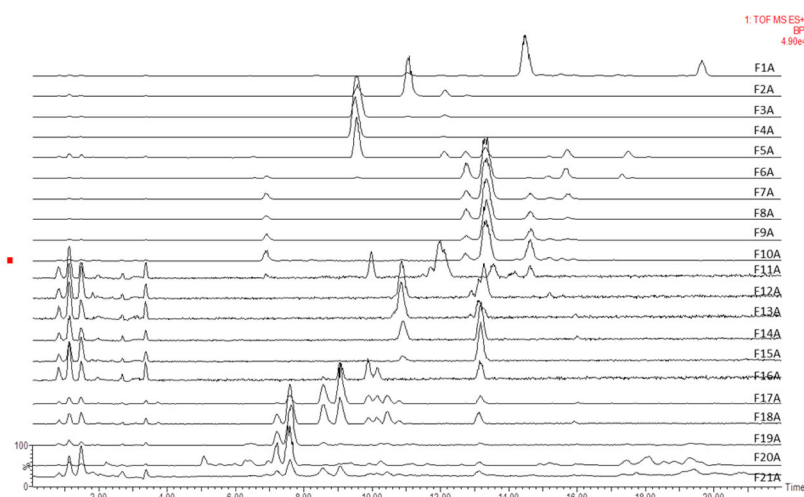
characteristics with literature data, while metabolites with the annotation level 3 correspond to minor metabolites detected only by LC-MS and putatively identified as resveratrol dimer, hydroxylated resveratrol dimer, dihydroxylated resveratrol dimer, or resveratrol trimer (Figures 3 and 4).

On the 2D HCA correlation map of extract A, several well-defined clusters were intensely colored in yellow (Figure 1). Cluster 1 corresponded to an intense cluster of 10  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts. After entering these chemical shifts into a database containing  $^{13}\text{C}$  NMR data of natural compounds, including ca. 110 known stilbene structures from different plant genera, the structure of *trans*-resveratrol (1) was proposed as the first hit out of 71 proposals. This structure was confirmed by checking all the chemical shifts of *trans*-resveratrol in NMR spectra of fractions F3<sub>A</sub> and F4<sub>A</sub> in which the intensity of cluster 1 was predominant. LC-MS analyses also revealed in these fractions an intense molecular ion at  $m/z$  229.0854 with a retention time of 9.5 min corresponding to the protonated molecular ion  $[\text{M} + \text{H}]^+$  of *trans*-resveratrol (Figure 3). By using the same method, clusters 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 were identified as  $\epsilon$ -viniferin (2), *trans*-piceatannol (3), pallidol (4), scirpusin A (5), eriodictyol (6), naringenin (7), and methyl jasmonate (8), respectively. Compound 8 corresponded to the residual MeJA introduced into the culture medium for hairy root elicitation. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data of compounds 1–8 are shown in the Supporting Information, Figures S2–S9, and their retention times and molecular ions detected by LC-MS in the positive ionization mode are given in

Figure 3. As the principle of a clustering analysis is to organize a data set “hierarchically”, the other less intense  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift clusters corresponding to minor compounds were not sufficiently resolved to identify additional molecular structures by  $^{13}\text{C}$  NMR dereplication. By scrutinizing the 2D HSQC, HMBC, and COSY NMR spectra of fractions F14<sub>A</sub>, F15<sub>A</sub>, and F16<sub>A</sub> containing the signals of cluster 9, a dimer was identified as maackin (9) and confirmed by the LC-MS detection of an intense molecular ion of  $m/z$  487.1228 in these fractions at a retention time of 13.1 min. Its configuration remained undetermined because the  $^1\text{H}$  NMR signals of the oxymethine moieties were overlapped by the residual water signal at  $\delta$  4.7 ppm. The presence of maackin (9) has previously been reported in the aerial parts of *Caragana rosea*,<sup>30</sup> in the wood of *Maackia amurensis*,<sup>31,32</sup> and in *Vitis vinifera* stalks.<sup>33</sup> Other minor dimeric stilbenes were detected by LC-MS in the fractions obtained from the culture medium (Figure 3), but exact mass measurements permitted assignment of only a molecular formula to these compounds and resulted in their putative identification with an MSI annotation level of 3. Regarding the HCA correlation of extract B (crude hairy root extract), several intense-yellow  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shift clusters were also observed (Figure 2). The cluster X<sub>1</sub> corresponded to nonstilbene compounds of low polarity eluted early in fractions F1<sub>B</sub> and F2<sub>B</sub> of the CPC experiment. This cluster X<sub>1</sub> was not further considered in this study.

As observed in the culture medium extract, the major stilbenes identified in the hairy root extract by dereplication





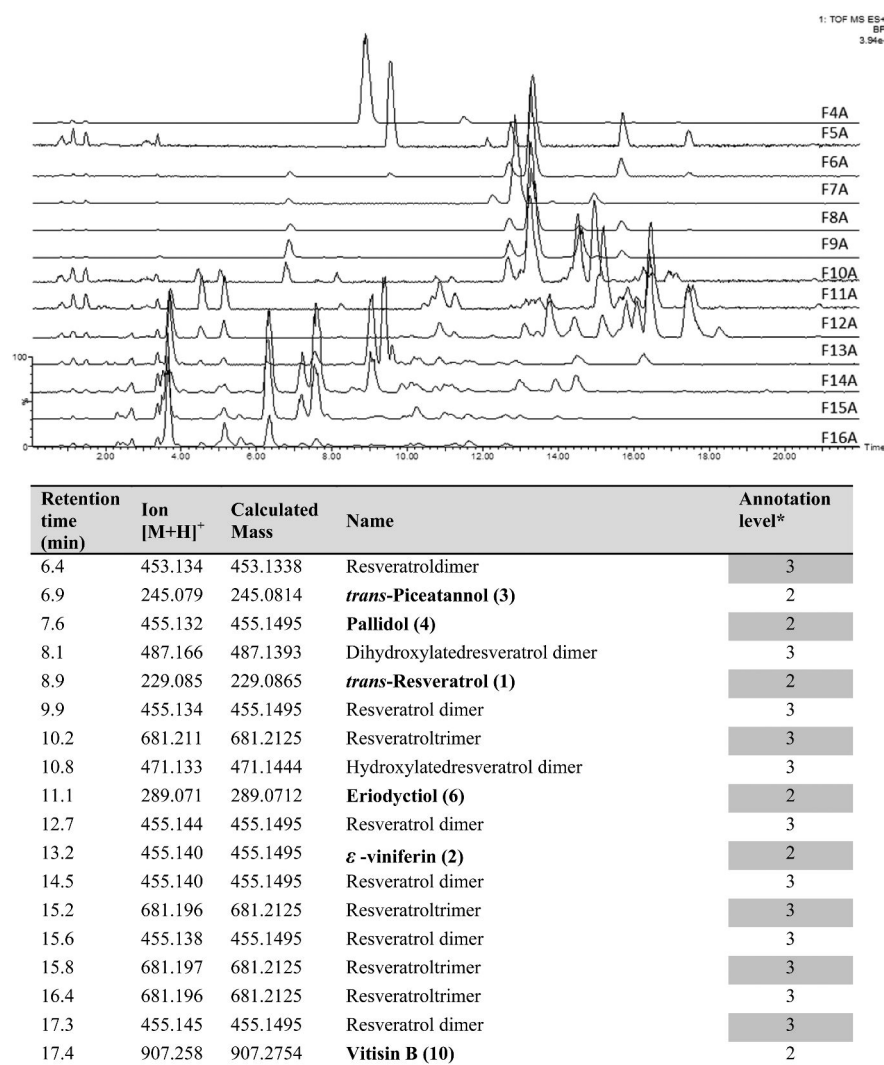
Retention time (min)	Ion [M+H] <sup>+</sup>	Calculated Mass	Name	Annotation level
5.1	455.132	455.1495	Resveratrol dimer	3
6.9	245.079	245.0814	<i>trans</i> -Piceatannol (3)	2
7.6	455.132	455.1495	Pallidol (4)	2
8.9	229.085	229.0865	<i>trans</i> -Resveratrol (1)	2
9.9	455.134	455.1495	Resveratrol dimer	3
9.9	471.126	471.1444	Hydroxylatedresveratrol dimer	3
10.8	471.133	471.1444	Hydroxylated dimer	3
11.1	289.071	289.0712	Eriodyctiol (6)	2
11.2	471.132	471.1444	Scirpusin A (5)	2
11.5	229.085	229.0865	<i>cis</i> -Resveratrol	2
12.1	471.127	471.1444	Hydroxylatedresveratrol dimer	3
12.7	455.144	455.1495	Resveratrol dimer	3
13.1	487.127	487.1393	Maackin (9)	2
13.2	455.14	455.1495	$\epsilon$ -viniferin (2)	2
13.2	487.124	487.1393	Resveratrol dimer	3
13.8	455.139	455.1495	Resveratrol dimer	3
14.3	273.074	273.0763	Naringenin (7)	2
14.5	455.14	455.1495	Resveratrol dimer	3
15.2	471.14	471.1444	Hydroxylatedresveratrol dimer	3
15.6	455.138	455.1495	Resveratrol dimer	3
17.3	455.145	455.1495	Resveratrol dimer	3

**Figure 3.** LC-MS chromatograms of the CPC fractions obtained from extract A (culture medium analysis). Annotation levels are given according to MSI recommendations. Level 1: non-novel compounds identified by a minimum of two independent and orthogonal data relative to an authentic compound analyzed under identical experimental conditions. Level 2: compounds identified by comparison with literature values. Level 3: putatively characterized compound classes. Level 4: unknown compounds even if differentiated and quantified by spectral analysis.

were *trans*-resveratrol (1),  $\epsilon$ -viniferin (2), *trans*-piceatannol (3), and pallidol (4). The presence of *trans*-resveratrol (1) was also confirmed by LC-MS with an intense protonated molecular ion [M + H]<sup>+</sup> at  $m/z$  229.0851 detected in the positive ion mode at a retention time of 8.9 min in fractions F3<sub>B</sub> and F4<sub>B</sub> (Figure 4). The presence of  $\epsilon$ -viniferin (2) in fractions F5<sub>B</sub>–F8<sub>B</sub> was confirmed by checking all the chemical shifts in the NMR spectra of these fractions and by LC-MS analyses, which revealed a protonated molecular ion [M + H]<sup>+</sup> at  $m/z$  455.1432 at a retention time of 13.3 min. Identification of *trans*-piceatannol (3) in the same fractions F5<sub>B</sub>–F8<sub>B</sub> and pallidol (4) in fractions F12<sub>B</sub>–F14<sub>B</sub> was also confirmed by LC-MS with protonated molecular ions [M + H]<sup>+</sup> detected at  $m/z$  245.0762 ( $t_R$  6.8 min) and  $m/z$  455.1437 ( $t_R$  7.6 min) in the corresponding fractions, respectively (Figure 4). These results indicate that the four major metabolites excreted into the culture medium under elicitation were also retained either at the cell wall level<sup>34</sup> or within the roots as intracellular

metabolites. Interestingly, a tetramer was identified as the major compound of fraction F11<sub>B</sub>. After entering the <sup>13</sup>C NMR chemical shift values of cluster 10 in the database, the structures of vitisins B (10) and C were proposed as first and second hits, respectively, over three proposals. HSQC, HMBC, and COSY NMR analyses of fraction F11<sub>B</sub> confirmed the molecular skeleton of both isomers, but the coupling constant of H-8c ( $\delta$  4.27, <sup>3</sup>J<sub>7c,8c</sub> 4.9 Hz) allowed the unambiguous confirmation of the structure of vitisin B (10).<sup>35</sup> A range of minor compounds were detected by LC-MS analyses, mainly resveratrol dimers and trimers with protonated molecular ions at  $m/z$  455 and  $m/z$  681, respectively. These compounds were not present at sufficient concentrations for unambiguous NMR structural elucidation and thus are designated in Figure 3 with an MSI annotation level of 3.

In terms of bioproduction, the sum of the stilbene-containing fraction masses represented the equivalent of 611.3 mg/L in the culture medium and 3.1 mg/g FW for the roots. This



**Figure 4.** LC-MS chromatograms of the CPC fractions obtained from extract B (hairy root analysis). Annotation levels are given according to MSI recommendations. Level 1: non-novel compounds identified by a minimum of two independent and orthogonal data relative to an authentic compound analyzed under identical experimental conditions. Level 2: compounds identified by comparison with literature values. Level 3: putatively characterized compound classes. Level 4: unknown compounds even if differentiated and quantified by spectral analysis.

approximately represents a stilbene excretion level of 9.2 mg/g FW and an intracellular level of 3.1 mg/g FW, hence a total specific production of 12.3 mg/g FW. As a comparison, the highest total stilbene production reported so far from cell suspensions is 13.4 mg/g FW.<sup>36</sup> As the root biomass per volume of culture was relatively low (6.6 g FW/L) in comparison to grapevine cell suspensions that can reach up to more than 500 g FW/L culture,<sup>36–38</sup> it is expected that such a system could still be improved for larger scale stilbene production.

In summary, this study has shown that hairy roots of *V. vinifera* cv. Pinot Noir are able to synthesize and excrete a variety of stilbene oligomers with *trans*-resveratrol (1) and *ε*-viniferin (2) as the two major metabolites. A variety of less common derivatives, including the monomer piceatannol (3), the dimers pallidol (4), scirpusin A (5), and maackin (9), and the tetramer vitisin B (10), were also produced. These latter compounds are currently not commercially available, although they have potential pharmacological activities.<sup>39–41</sup> This is the first chemical profiling of stilbene-producing hairy roots. Further work will consist in obtaining greater biomass

accumulation before elicitation. The testing of different elicitors and sampling times after induction to select culture and induction conditions could favor the production of different high-value resveratrol derivatives. Together with the use of this particular sequenced Pinot Noir line, these data will enable stilbene metabolism in roots to be investigated further.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemicals and Reagents.** *n*-Heptane, EtOAc, and MeOH were purchased from Carlo Erba Reactifs SDS (Val de Reuil, France). MeOH LC-MS grade was purchased from VWR Chemical (Fontenay-sous-Bois, France). Methanol-*d*<sub>4</sub> was purchased from Eurisotop (Saint-Aubin, France). Deionized water was used to prepare all aqueous solutions. Methyl jasmonate (MeJA), W-7 CAVASOL M cyclodextrins (CDs), and formic acid LC-MS grade were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Schenk and Hildebrandt (SH) basal salt mixture, vitamin mixture, and sucrose were purchased from Duchefa (Haarlem, The Netherlands). Water ( $\rho = 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) was delivered by an ultrapure water system (ALPHA-Q, Milli-Q plus Millipore, Darmstadt, Germany).

**Plant Material.** Hairy roots were generated from *in vitro* plantlets of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir PN 40027 cultivar using *Rhizobacterium rhizogenes* ATCC 15834. The roots were cultivated in modified 1/2

Table 2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Data for the Identified Metabolites (in Methanol- $d_4$ )<sup>a</sup>

position	1		2		3		4		5	
	<i>trans</i> -resveratrol		<i>ε</i> -viniferin		<i>trans</i> -piceatannol		pallidol		scirpusin A	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1a	128.9		132.4		129.6		137.0		133.4	
2a	127.4	7.37	126.8	7.16	112.4	6.99	127.8	6.94	117.1	6.66
3a	115.1	6.78	114.9	6.79	145.1		114.6	6.68	114.8	6.76
4a	156.8		156.8		145.0		154.9		144.9	
5a	115.1	6.78	114.9	6.79	115.0	6.76	114.6	6.68	145.2	
6a	127.4	7.37	126.8	7.16	118.8	6.85	127.8	6.94	112.3	6.77
7a	127.9	6.97	93.3	5.39	128.2	6.91	53.3	4.49	93.5	5.32
8a	125.6	6.81	56.6	4.37	125.6	6.76	59.5	3.74	56.9	4.35
9a	139.8		145.9		139.9		149.4		146.0	
10a	104.4	6.46	106.1	6.19	104.3	6.46	122.4		105.9	6.18
11a	158.1		158.4		158.2		154.1		158.3	
12a	101.2	6.17	100.8	6.21	101.2	6.18	101.1	6.12	100.8	6.19
13a	158.1		158.4		158.2		157.9		158.3	
14a	104.4	6.46	106.1	6.19	104.3	6.46	102.0	6.54	105.9	6.18
1b			128.9				137.0		128.9	
2b			127.4	7.06			127.8	6.94	127.3	7.39
3b			115.0	6.68			114.6	6.68	115.1	6.79
4b			158.0				154.9		156.9	
5b			115.0	6.68			114.6	6.68	115.1	6.79
6b			127.4	7.06			127.8	6.94	127.3	7.39
7b			128.9	6.84			53.3	4.49	128.9	6.84
8b			122.3	6.59			59.5	3.74	122.3	6.59
9b			135.4				149.4		135.6	
10b			118.7				122.4		118.6	
11b			161.1				154.1		161.4	
12b			95.5	6.28			101.1	6.12	95.4	6.27
13b			158.0				157.9		158.3	
14b			103.0	6.66			102.0	6.54	102.9	6.66
position	6		7		8					
	eriodictyol		naringenin		methyl jasmonate					
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$				
1				220.4						
2	79.1	5.29	79.1	5.36	38.4	2.71/2.38				
3	42.8	2.72/3.08	42.7	2.72/3.13	26.6	2.22/1.53				
4	196.3		196.4		37.7	2.32				
5	164.5		164.1		53.7	1.98				
6	95.6	5.89	95.6	5.90	24.8	3.37				
7	167.1		166.9		124.8	5.27				
8	94.8	5.91	94.8	5.92	133.4	5.46				
9	163.1		163.4		20.1	2.09				
10	101.9		101.6		13.1	0.98				
1'	130.3		129.7		37.3	2.35/2.11				
2'	117.7	6.80	127.6	7.33	174.6					
3'	114.8	6.81	114.9	6.84	53.7	1.97				
4'	145.5		157.6							
5'	145.1		114.9	6.84						
6'	113.1	6.93	127.6	7.33						
position	9		10							
	maackiin		vitisin B							
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$						
1a	129.0	-	132.5	-						
2a	114.4	7.18	126.8	7.16						
3a	144.9		114.9	6.79						
4a	145.3		157.1							
5a	115.1	6.67	114.9	6.79						
6a	119.4	6.49	126.8	7.16						
7a	80.8	4.73	93.5	5.40						

Table 2. continued

position	9		10	
	maackin		vitisin B	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$\delta_C$	$\delta_H$
8a	80.5	4.75	57.6	4.44
9a	145.2		145.9	
10a	104.5	6.49	106.1	6.17
11a	158.3		158.6	
12a	101.6	6.20	100.8	6.16
13a	158.3		158.6	
14a	104.5	6.49	106.1	6.16
1b	131.2		130.9	
2b	114.9	6.67	125.3	7.00
3b	144.8		109.2	6.71
4b	143.9		158.8	
5b	116.7	6.99	118.6	
6b	119.5	7.10	124.1	6.68
7b	127.8	7.00	129.1	6.70
8b	127.1	6.89	122.8	6.52
9b	139.7		135.4	
10b	104.5	6.49	103.2	6.60
11b	157.9		158.2	
12b	101.6	6.20	95.5	6.27
13b	157.9		161.7	
14b	104.5	6.49	118.9	
1c			131.3	
2c			126.5	6.61
3c			114.6	6.55
4c			156.6	
5c			114.6	6.55
6c			126.5	6.61
7c			90.9	5.45
8c			51.5	4.27
9c			141.0	
10c			106.0	6.12
11c			158.9	
12c			95.2	6.30
13c			161.4	
14c			118.7	
1d			133.2	
2d			126.4	7.20
3d			115.0	6.85
4d			157.0	
5d			115.0	6.85
6d			126.4	7.20
7d			93.4	5.35
8d			56.9	4.36
9d			146.4	
10d			105.6	6.00
11d			158.8	
12d			101.1	6.09
13d			158.6	
14d			105.6	6.00

<sup>a</sup> $\delta_H$  are reported from HSQC spectral data

Schenk and Hildebrandt medium (SH)<sup>29</sup> with 1:100 microelements and 2% sucrose at pH 5.8. They were cultivated in 250 mL flasks with 100 mL of culture medium and initiated with 15 primary root tips, 2 cm long. The flasks were placed on 110 rpm rotary shakers in the dark for 40 days, and the culture medium was renewed every 10 days. After 40 days, the culture medium was changed to a fresh one containing 50 mM W-7 CAVASOL methyl-CDs and 100  $\mu$ M MeJA in EtOH. The final EtOH concentration in the culture medium was 0.1% (v/v). Total

roots and culture medium were sampled after 4 days. Roots were frozen and ground in liquid N<sub>2</sub> before extraction, and the culture medium extract was prepared immediately.

**Preparation of Crude Stilbene Extracts.** Two samples were prepared and analyzed: (A) from the culture medium (total volume 1210 mL), a crude stilbene extract (3.1 g) was obtained after three successive extractions with EtOAc (3  $\times$  1 L) in a separatory funnel followed by solvent evaporation under vacuum; (B) from the hairy

roots (total mass = 80.4 g of FW ground in liquid N<sub>2</sub>), a crude stilbene extract (6.6 g) was obtained after a first extraction with 1 L of MeOH (85%) at room temperature for 2 h and a second extraction on the solid residue with 1 L of MeOH (100%) at room temperature for 1 h, followed by filtration and solvent evaporation under vacuum.

**Fractionation of Crude Stilbene Extracts by Centrifugal Partition Chromatography.** Fractionation experiments were developed on a lab-scale CPC column of 303 mL capacity (FCPE300, Rousselet Robatel Kromaton, Annonay, France) containing seven circular partition disks, engraved with a total of 231 oval partition twin-cells (ca. 1 mL per twin-cell). The liquid phases were pumped with a Knauer Preparative 1800 V7115 pump (Berlin, Germany). The column was coupled online with a UVD 170S detector set at 210, 254, 280, and 366 nm (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Fractions were collected by a Pharmacia Superfrac collector (Uppsala, Sweden).

Both samples were fractionated by using a gradient elution method. Two biphasic solvent systems were prepared independently by mixing *n*-heptane, EtOAc, MeOH, and H<sub>2</sub>O in the proportions 5/6/5/6 (v/v) for system 1 and 2/5/2/5 (v/v) for system 2. These two systems were selected in order to increase the polarity of the mobile phase gradually during the gradient from system 1 to system 2 (with a higher content of EtOAc than the initial *n*-heptane-rich mobile phase of system 1) while ensuring the biphasic character of the overall system with MeOH and H<sub>2</sub>O as the major constituents in the lower phase. The sample solution was prepared by directly dissolving the crude stilbene extracts (2.2 g of extract A or 3.7 g of extract B) in 30 mL of a mixture of upper and lower phases of system 1 (50/50, v/v). The CPC column was filled with the lower aqueous phase of system 1 at 500 rpm. The rotation speed was then adjusted to 1200 rpm. The upper organic phase of system 1 was used as the initial mobile phase in the ascending mode. After loading the sample solution onto the column through a 35 mL sample loop, the flow rate was gradually increased from 0 to 20 mL/min in 3 min and maintained at 20 mL/min over the whole experiment. The gradient was performed by pumping 100% of the upper phase of system 1 for 5 min, and then this phase was decreased from 100% to 80% in 40 min, from 80% to 20% in 60 min, and from 20% to 0% in 20 min. The upper phase of system 2 was maintained at 100% for 35 min. Finally, the column was extruded by switching from the ascending to the descending mode, while still pumping 100% of the upper phase of system 2 at 20 mL/min. Experiments were conducted at room temperature. Fractions were collected every minute and analyzed by TLC. Fractions were pooled according to their TLC profile similarities, and the solvent was evaporated under vacuum. As a result, 21 fractions were recovered from extract A and 16 from extract B. The stationary phase extruded from the CPC column at the end of the fractionation of each extract was also evaporated to dryness and analyzed by <sup>13</sup>C NMR in order to confirm that no more stilbenes were retained inside the column at the end of the fractionation experiments.

**NMR Analyses and Dereplication.** An aliquot of each fraction (from 20 to 25 mg) from both experiments was dissolved in 550 μL of methanol-*d*<sub>4</sub>. NMR analyses were performed at 298 K on a Bruker Avance AVIII-600 spectrometer (Karlsruhe, Germany) equipped with a TXI cryoprobe optimized for <sup>1</sup>H detection and with cooled <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C coils and preamplifiers. <sup>13</sup>C NMR spectra were acquired at 150.91 MHz. A standard zgpg pulse sequence was used with an acquisition time of 0.909 s and a relaxation delay of 3 s. For each sample, 1024 scans were coadded to obtain a satisfactory signal-to-noise ratio. The spectral width was 238.9070 ppm, and the receiver gain was set to the highest possible value. A 1 Hz line broadening filter was applied to each FID prior to Fourier transformation. The c13cryo macro was used to correct the typical roll of the baseline due to the high *Q* of cryoprobes. The spectra were manually phased and baseline corrected using the TOPSPIN 3.2 software (Bruker) and calibrated on the central resonance of methanol-*d*<sub>4</sub> (δ 49.1 ppm). The absolute intensities of all <sup>13</sup>C NMR signals were automatically collected by using a minimum intensity threshold of 0.3% (relative to the most intense signal of each spectrum). Each peak list was stored as a text file. The collected peaks in each fraction series (extracts A and B independently) were subsequently binned using a locally developed

computer script written in Python language. Its goal was to divide the <sup>13</sup>C spectral width (from 0 to 220 ppm) into regular chemical shift intervals (Δδ = 0.2 ppm) and to associate the absolute intensity of each <sup>13</sup>C NMR peak with the corresponding bin. The bins for which no signal was detected in any fraction were removed from the bin list. The resulting tables (one table for fractions of extract A and one table for those of extract B) were imported into the Permut Matrix version 1.9.3 software (LIRMM, Montpellier, France) for clustering analysis on raw peak intensity values. The classification was performed on the rows only, i.e., on the chemical shift bins. The Euclidian distance was used to measure the proximity between samples, and Ward's method was applied to agglomerate the data. The resulting <sup>13</sup>C NMR chemical shift clusters were visualized as dendrograms on a 2D map. The higher the intensity of <sup>13</sup>C NMR peaks, the brighter the color on the map (Figures 1 and 2). In parallel, a literature survey was carried out to obtain the names and structures of known natural stilbenes. In total, 101 compounds were found, mostly including monomers, dimers, and tetramers of resveratrol. These metabolites were added to a locally built <sup>13</sup>C NMR chemical shift database (ACD/NMR Workbook Suite 2012 software, ACD/Laboratories, Ontario, Canada) comprising the chemical shifts and structures of other natural products (ca. 1500 in February 2016). Structures were drawn with ACD/Laboratories ChemSketch. A <sup>13</sup>C NMR spectrum was calculated with the ACD/Laboratories CNMR Predictor software, and the resulting <sup>13</sup>C NMR chemical shifts were supplied to the database. For metabolite identification, each <sup>13</sup>C NMR chemical shift cluster obtained from HCA was manually submitted to the structure search engine of the database management software. A <sup>13</sup>C NMR chemical shift tolerance of ±2 ppm was used, and the computation time for each search was less than 1 s.

**LC-MS Analysis.** Samples were analyzed using an Alliance HPLC coupled with an electrospray-quadrupole-time-of-flight Synapt G1 mass spectrometer (ESI (+)-q-TOF-MS) purchased from Waters (St Quentin en Yvelines, France). The elution was performed with a flow rate of 1 L/min through an RP18 reversed-phase column (Uptisphere Strategy, 4.6 × 250 mm, 5 μm particle size, Interchim (Montluçon, France)) with an injection volume of 10 μL. The solvents were formic acid 1% in ultrapure H<sub>2</sub>O (A) and MeOH LC-MS grade (B). The gradient started at 25% (B) and increased up to 50% in 20 min for 1 min, then reached 100% in 3 min and remained for 1 min. After that, the gradient returned to 25% (B) in 5 min. The column was kept at 30 °C in the oven of the HPLC. The ESI was operated in positive mode with the following parameters: capillary voltage 3 kV, sampling cone 40 V, extraction cone 4 V, source temperature 120 °C, desolvation 500 L/h, collision energy 6 V. Nitrogen was delivered by an FDGS. Accurate mass was ensured using a solution of leu-enkephalin as a standard compound in the internal lockmass. The TOF was set to detect ions from *m/z* 50 to 1000.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00608.

<sup>13</sup>C NMR profiles of the extrusion fractions; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of compounds 1–10 (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: +33326913441. Fax: +33326913427. E-mail: eric.courot@univ-reims.fr.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Champagne-Ardenne Region, the CNRS, and the Ministry of Higher Education and Research for financial support, as well as the EU-program FEDER for the PLAnET CPER project. We thank C. Robins for English corrections of the manuscript.

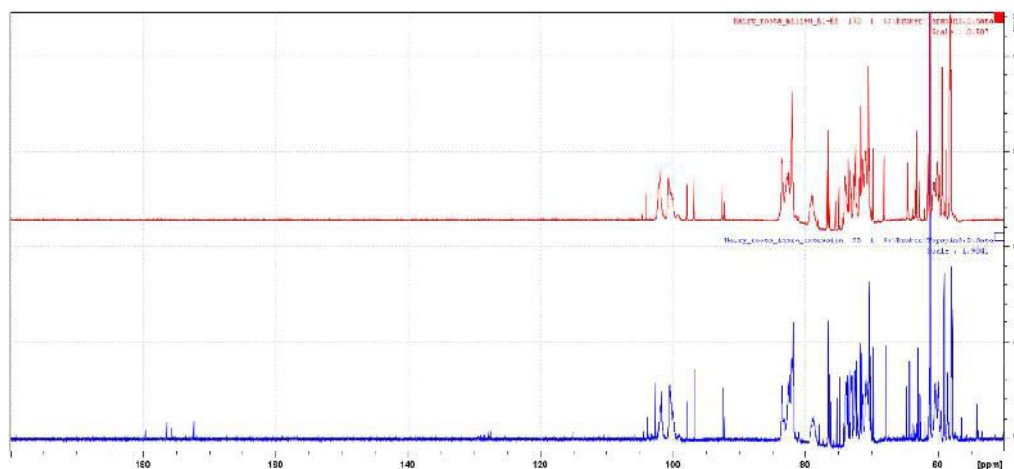
## REFERENCES

- (1) Abe, N.; Ito, T.; Ohguchi, K.; Nasu, M.; Masuda, Y.; Oyama, M.; Nozawa, Y.; Ito, M.; Inuma, M. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1499–1506.
- (2) Chen, X.; Qiao, H.; Liu, T.; Yang, Z.; Xu, L.; Xu, Y.; Ge, H. M.; Tan, R. X.; Li, E. *Antiviral Res.* **2012**, *95*, 30–36.
- (3) Chung, E. Y.; Kim, B. H.; Lee, M. K.; Yun, Y. P.; Lee, S. H.; Min, K. R.; Kim, Y. *Planta Med.* **2003**, *69*, 710–714.
- (4) Lee, J. Y.; Kim, J. H.; Kang, S. S.; Bae, C. S.; Choi, S. H. *Am. J. Chin. Med.* **2004**, *32*, 521–530.
- (5) Wang, X. F.; Yao, C. S. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2016**, *18*, 376–407.
- (6) Xue, Y.-Q.; Di, J.-M.; Luo, Y.; Cheng, K.-J.; Wei, X.; Shi, Z. *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2014**, *15*, 757–765.
- (7) Baell, J. B. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 616–628.
- (8) Bisson, J.; McAlpine, J. B.; Friesen, J. B.; Chen, S.-N.; Graham, J.; Pauli, G. F. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1671–1690.
- (9) Donnez, D.; Jeandet, P.; Clément, C.; Courot, E. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 706–713.
- (10) Jeandet, P.; Delaunois, B.; Aziz, A.; Donnez, D.; Vasserot, Y.; Cordelier, S.; Courot, E. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*, 110.1155/2012/579089.
- (11) Jeandet, P.; Clément, C.; Courot, E. *Eng. Life Sci.* **2014**, *14*, 622–632.
- (12) Riker, A. J.; Banfield, W. M.; Wright, W. H.; Keitt, G. W.; Sagen, H. E. *J. Agric. Res.* **1930**, *41*, 507–540.
- (13) Shams, M.; Vial, L.; Chapulliot, D.; Nesme, X.; Lavire, C. *Syst. Appl. Microbiol.* **2013**, *36*, 351–358.
- (14) Georgiev, M. I.; Pavlov, A. I.; Bley, T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 1175–1185.
- (15) Giri, A.; Narasu, M. L. *Biotechnol. Adv.* **2000**, *18*, 1–22.
- (16) Georgiev, M. I.; Agostini, E.; Ludwig-Müller, J.; Xu, J. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 528–537.
- (17) Medina-Bolivar, F.; Condori, J.; Rimando, A. M.; Hubstenberger, J.; Shelton, K.; O’Keefe, S. F.; Bennett, S.; Dolan, M. C. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1992–2003.
- (18) Nopo-Olazabal, C.; Hubstenberger, J.; Nopo-Olazabal, L.; Medina-Bolivar, F. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11744–11758.
- (19) Tassoni, A.; Fornalè, S.; Franceschetti, M.; Musiani, F.; Michael, A. J.; Perry, B.; Bagni, N. *New Phytol.* **2005**, *166*, 895–905.
- (20) Taurino, M.; Ingrosso, I.; D’amico, L.; De Domenico, S.; Nicoletti, I.; Corradini, D.; Santino, A.; Giovinazzo, G. *SpringerPlus* **2015**, *4*, 49.
- (21) Bru, R.; Sellés, S.; Casado-Vela, J.; Belchí-Navarro, S.; Pedreño, M. A. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 65–71.
- (22) Jeandet, P.; Clément, C.; Tisserant, L. P.; Crouzet, J.; Courot, E. *C. R. Chim.* **2016**, *19*, 1062–1070.
- (23) Belchí-Navarro, S.; Almagro, L.; Lijavetzky, D.; Bru, R.; Pedreño, M. A. *Plant Cell Rep.* **2012**, *31*, 81–89.
- (24) Lijavetzky, D.; Almagro, L.; Belchí-Navarro, S.; Martínez-Zapater, J. M.; Bru, R.; Pedreño, M. A. *BMC Res. Notes* **2008**, *1*, 132–140.
- (25) Bru Martínez, R.; Pedreño García, M. A. U.S. Patent 0205049 A1, 2006.
- (26) Walker, J. R. L.; Ferrar, P. H. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1998**, *15*, 457–498.
- (27) Berthod, A.; Hassoun, M.; Ruiz-Angel, M. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *383*, 327–340.
- (28) Lins, A. P.; Felício, J. D.; Braggio, M. M.; Roque, L. C. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3144–3146.
- (29) Sumner, L. W.; Amberg, A.; Barrett, D.; Beale, M. H.; Beger, R.; Daykin, C. A.; Fan, T. W. M.; Fiehn, O.; Goodacre, R.; Griffin, J. L.; Hankemeier, T.; Hardy, N.; Harnly, J.; Higashi, R.; Kopka, J.; Lane, A. N.; Lindon, J. C.; Marriott, P.; Nicholls, A. W.; Reilly, M. D.; Thaden, J. J.; Viant, M. R. *Metabolomics* **2007**, *3*, 211–221.
- (30) Yang, G.; Zhou, J.; Li, Y.; Hu, C. *Planta Med.* **2005**, *71*, 569–571.
- (31) Kulesh, N. I.; Maksimov, O. B.; Fedoreev, S. A.; Denisenko, V. A.; Glasunov, V. P.; Pokushalova, T. V.; Glebko, L. I. *Chem. Nat. Compd.* **1999**, *35*, 575–579.
- (32) Kulesh, N. I.; Isakov, V. V.; Maksimov, O. B. *Chem. Nat. Compd.* **1992**, *28*, 407–414.
- (33) Papastamoulis, Y.; Richard, T.; Nassra, M.; Badoc, A.; Krisa, S.; Harakat, D.; Monti, J. P.; Mérillon, J. M.; Waffo-Teguo, P. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 213–217.
- (34) Lange, B. M.; Trost, M.; Heller, W.; Langebartels, C.; Sandermann, H. *Planta* **1994**, *194*, 143–148.
- (35) Castellano, G.; Lara, A.; Torrens, F. *Phytochemistry* **2014**, *97*, 62–69.
- (36) Vera-Urbina, J. C.; Selles-Marchart, S.; Martínez-Esteso, M. J.; Pedreño, M. A.; Bru-Martínez, R. In *Resveratrol: Sources, Production and Health Benefits*; Delmas, D., Ed.; Nova Science Publishers Inc: New York, 2013; Chapter 2, pp 19–40.
- (37) Aumont, V.; Larronde, F.; Richard, T.; Budzinski, H.; Decendit, A.; Deffieux, G.; Krisa, S.; Mérillon, J. M. *J. Biotechnol.* **2004**, *109*, 287–294.
- (38) Donnez, D.; Kim, K. H.; Antoine, S.; Conreux, A.; De Luca, V.; Jeandet, P.; Clément, C.; Courot, E. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1056–1062.
- (39) Houillé, B.; Papon, N.; Boudesocque, L.; Bourdeaud, E.; Besseau, S.; Courdavault, V.; Enguehard-Gueiffier, C.; Delanoue, G.; Guérin, L.; Bouchara, J. P.; Clastre, M.; Giglioli-Guivarc’h, N.; Guillard, J.; Lanoue, J. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1658–1662.
- (40) Xue, Y. Q.; Di, J. M.; Luo, Y.; Cheng, K. J.; Wei, X.; Shi, Z. *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2014**, *2014*, 1.
- (41) Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2002**, *26*, 507–579.

## Supporting Information

- S1.  $^{13}\text{C}$  NMR profiles of the extrusion fractions
- S2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of *trans*-resveratrol (1)
- S3.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of  $\epsilon$ -viniferin (2)
- S4.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of *trans*-piceatannol (3)
- S5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of pallidol (4)
- S6.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of scirpusin A (5)
- S7.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of eriodictyol (6)
- S8.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of naringenin (7)
- S9.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of methyl jasmonate (8)
- S10.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of maackin (9)
- S11.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of vitisin B (10)

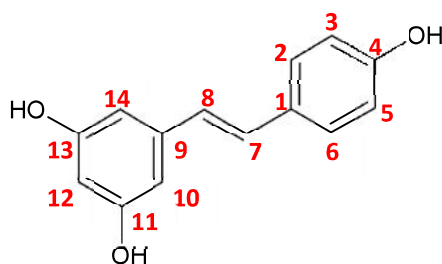
**S1.**



**S1.** <sup>13</sup>C NMR profiles of the extrusion fractions recovered after fractionation of extracts A and B, respectively. Signals detected at 55-110 ppm corresponded to sugars and residual methyl-CDs retained inside the CPC column over the whole experiments. No stilbenes were detected in these fractions.



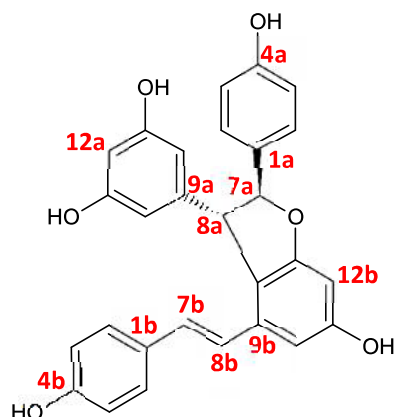
S2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of *trans*-resveratrol (1)



Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1a	128.9	-
2a	127.4	7.37
3a	115.1	6.78
4a	156.8	-
5a	115.1	6.78
6a	127.4	7.37
7a	127.9	6.97
8a	125.6	6.81
9a	139.8	-
10a	104.4	6.46
11a	158.1	-
12a	101.2	6.17
13a	158.1	-
14a	104.4	6.46

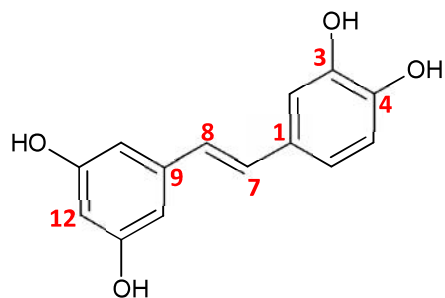
$\delta_{\text{H}}$  are reported from HSQC spectral data

S3.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of  $\epsilon$ -viniferin (2)



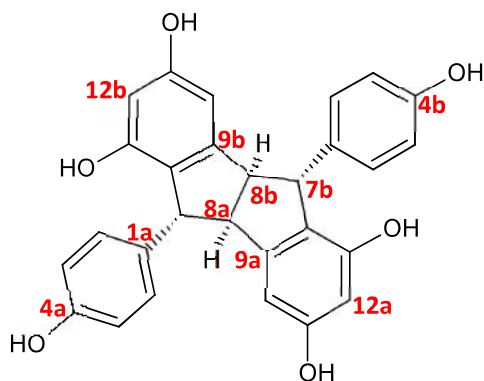
Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1a	132.4	-
2a	126.8	7.16
3a	114.9	6.79
4a	156.8	-
5a	114.9	6.79
6a	126.8	7.16
7a	93.3	5.39
8a	56.6	4.37
9a	145.9	-
10a	106.1	6.19
11a	158.4	-
12a	100.8	6.21
13a	158.4	-
14a	106.1	6.19
1b	128.9	-
2b	127.4	7.06
3b	115.0	6.68
4b	158.0	-
5b	115.0	6.68
6b	127.4	7.06
7b	128.9	6.84
8b	122.3	6.59
9b	135.4	-
10b	118.7	-
11b	161.1	-
12b	95.5	6.28
13b	158.0	-
14b	103.0	6.66

S4.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of *trans*-piceatannol (3)



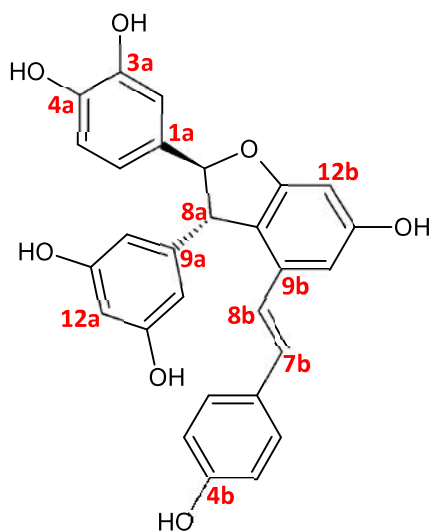
Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1a	129.6	-
2a	112.4	6.99
3a	145.1	-
4a	145.0	-
5a	115.0	6.76
6a	118.8	6.85
7a	128.2	6.91
8a	125.6	6.76
9a	139.9	-
10a	104.3	6.46
11a	158.2	-
12a	101.2	6.18
13a	158.2	-
14a	104.3	6.46

S5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of pallidol (4)



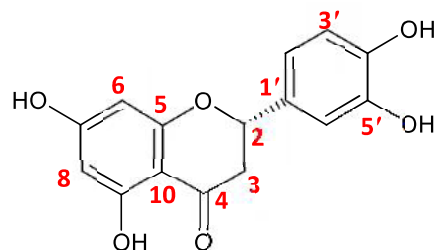
Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1a	137.0	-
2a	127.8	6.94
3a	114.6	6.68
4a	154.9	-
5a	114.6	6.68
6a	127.8	6.94
7a	53.3	4.49
8a	59.5	3.74
9a	149.4	-
10a	122.4	-
11a	154.1	-
12a	101.1	6.12
13a	157.9	-
14a	102.0	6.54
1b	137.0	-
2b	127.8	6.94
3b	114.6	6.68
4b	154.9	-
5b	114.6	6.68
6b	127.8	6.94
7b	53.3	4.49
8b	59.5	3.74
9b	149.4	-
10b	122.4	-
11b	154.1	-
12b	101.1	6.12
13b	157.9	-
14b	102.0	6.54

S6.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of scirpusin A (5)



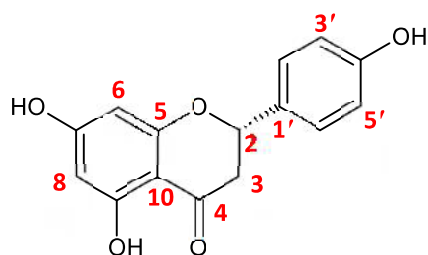
Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1a	133.4	-
2a	117.1	6.66
3a	114.8	6.76
4a	144.9	-
5a	145.2	-
6a	112.3	6.77
7a	93.5	5.32
8a	56.9	4.35
9a	146.0	-
10a	105.9	6.18
11a	158.3	-
12a	100.8	6.19
13a	158.3	-
14a	105.9	6.18
1b	128.9	-
2b	127.3	7.39
3b	115.1	6.79
4b	156.9	-
5b	115.1	6.79
6b	127.3	7.39
7b	128.9	6.84
8b	122.3	6.59
9b	135.6	-
10b	118.6	-
11b	161.4	-
12b	95.4	6.27
13b	158.3	-
14b	102.9	6.66

S7.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of eriodictyol (6)



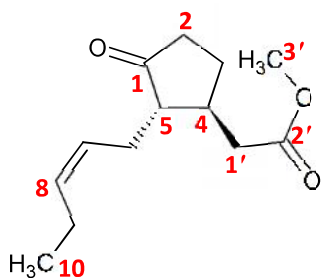
Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
2	79.1	5.29
3	42.8	2.72/3.08
4	196.3	-
5	164.5	-
6	95.6	5.89
7	167.1	-
8	94.8	5.91
9	163.1	-
10	101.9	-
1'	130.3	-
2'	117.7	6.80
3'	114.8	6.81
4'	145.5	-
5'	145.1	-
6'	113.1	6.93

S8.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of naringenin (7)



Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1		
2	79.1	5.36
3	42.7	2.72/3.13
4	196.4	-
5	164.1	-
6	95.6	5.90
7	166.9	-
8	94.8	5.92
9	163.4	-
10	101.6	-
1'	129.7	-
2'	127.6	7.33
3'	114.9	6.84
4'	157.6	-
5'	114.9	6.84
6'	127.6	7.33

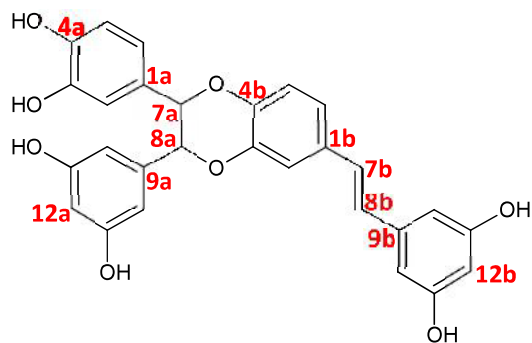
S9.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of methyl jasmonate (8)



Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1	220.4	-
2	38.4	2.71/2.38
3	26.6	2.22/1.53
4	37.7	2.32
5	53.7	1.98
6	24.8	3.37
7	124.8	5.27
8	133.4	5.46
9	20.1	2.09
10	13.1	0.98
1'	37.3	2.35/2.11
2'	174.6	-
3'	53.7	1.97

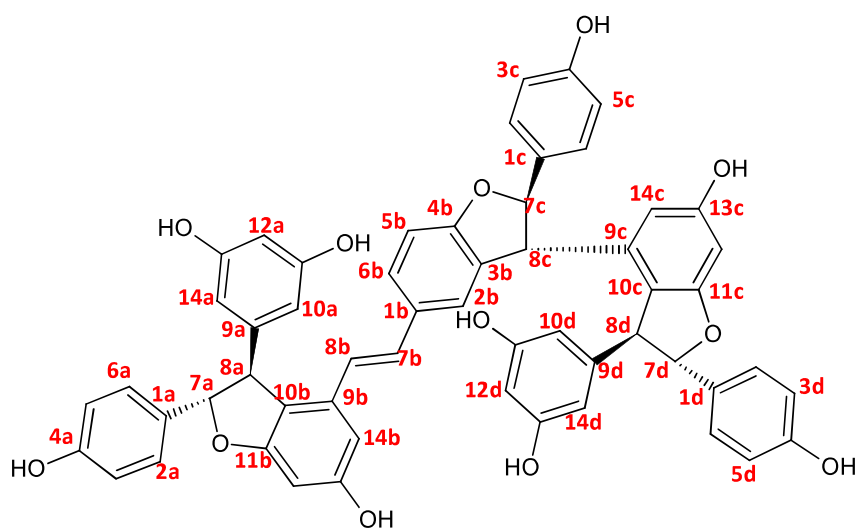


S10.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of maackin (9)



Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1a	129.0	-
2a	114.4	7.18
3a	144.9	-
4a	145.3	-
5a	115.1	6.67
6a	119.4	6.49
7a	80.8	4.73
8a	80.5	4.75
9a	145.2	-
10a	104.5	6.49
11a	158.3	-
12a	101.6	6.20
13a	158.3	-
14a	104.5	6.49
1b	131.2	-
2b	114.9	6.67
3b	144.8	-
4b	143.9	-
5b	116.7	6.99
6b	119.5	7.10
7b	127.8	7.00
8b	127.1	6.89
9b	139.7	-
10b	104.5	6.49
11b	157.9	-
12b	101.6	6.20
13b	157.9	-
14b	104.5	6.49

S11.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts of vitisin B (10)



Carbo	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1a	132.5	-
2a	126.8	7.16
3a	114.9	6.79
4a	157.1	-
5a	114.9	6.79
6a	126.8	7.16
7a	93.5	5.40
8a	57.6	4.44
9a	145.9	-
10a	106.1	6.17
11a	158.6	-
12a	100.8	6.16
13a	158.6	-
14a	106.1	6.16
1b	130.9	-
2b	125.3	7.00
3b	109.2	6.71
4b	158.8	-
5b	118.6	-
6b	124.1	6.68
7b	129.1	6.70
8b	122.8	6.52
9b	135.4	-
10b	103.2	6.60
11b	158.2	-
12b	95.5	6.27
13b	161.7	-
14b	118.9	-

Carbon	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
1c	131.3	-
2c	126.5	6.61
3c	114.6	6.55
4c	156.6	-
5c	114.6	6.55
6c	126.5	6.61
7c	90.9	5.45
8c	51.5	4.27
9c	141.0	-
10c	106.0	6.12
11c	158.9	-
12c	95.2	6.30
13c	161.4	-
14c	118.7	-
1d	133.2	-
2d	126.4	7.20
3d	115.0	6.85
4d	157.0	-
5d	115.0	6.85
6d	126.4	7.20
7d	93.4	5.35
8d	56.9	4.36
9d	146.4	-
10d	105.6	6.00
11d	158.8	-
12d	101.1	6.09
13d	158.6	-
14d	105.6	6.00

## 3<sup>ème</sup> Article : Le transport du *t*-resvératrol

---

Le resvératrol est une molécule de défense bien connue retrouvée dans différentes espèces telles que *Pinus* spp., *Arachis* spp. et *Vitis* spp. Chez la vigne, une grande variété de stilbènes avec des propriétés biologiques et pharmaceutiques particulières a été mise en évidence. Le transport de ces molécules est un paramètre crucial pour assurer une réponse de défense adaptée en cas d'attaque par un pathogène mais aussi car la compréhension des mécanismes d'excrétion de molécules d'intérêt par la plante est un outil nécessaire à l'optimisation d'un procédé de bioproduction.

Malgré l'intérêt porté au *t*-resvératrol depuis une vingtaine d'années, aucun transporteur spécifique de son excrétion n'a encore pu être caractérisé. Afin de faciliter la mise en évidence du transporteur de resvératrol, une étude a été réalisée sur un modèle simplifié, les cellules de vigne en suspension. Il pourra ensuite être caractérisé dans des modèles plus complexes tels que les racines transformées. La publication qui suit décrit les changements dans le protéome de la membrane plasmique de cellules de *Vitis labrusca* cv. Concord en suspension traitées au MeJA ou avec du *t*-resvératrol, mesurés par iTRAQ. Le transporteur de *t*-resvératrol est probablement un transport actif inductible par les traitements donnant lieu à une production et excrétion importante de *t*-resvératrol ou par le *t*-resvératrol lui-même.

Pour ce faire, des cultures de cellules de *Vitis labrusca* cv Concord ont été traitées avec du MeJA ou 50  $\mu$ M ou 500  $\mu$ M de *t*-resvératrol. Ces traitements visent à induire la synthèse du transporteur de *t*-resvératrol en induisant sa voie de biosynthèse et son excrétion dans le cas du MeJA ou en induisant son expression et sa synthèse par son propre substrat dans le cas du *t*-resvératrol. Les protéines totales de chaque modalité ont été extraites et les protéines de la membrane plasmique ont été enrichies et comparées à celles trouvées dans un échantillon non traité par iTRAQ. L'ensemble des protéines détectées a été annoté et la production de 155 protéines est apparue comme régulée par l'un ou plusieurs de ces traitements. Parmi celles-ci, 7 ont été identifiées comme des protéines similaires au transporteur AtABCG40 d'*A. thaliana* et sur-représentés dans ces conditions. L'implication d'ABC transporteurs dans l'excrétion du *t*-resvératrol est appuyée par des tests d'inhibition qui ont montré une diminution de la sortie de resveratrol des cellules traitées au glibenclamide, un inhibiteur général des ABC transporteurs Golstein *et al.*, 1999; Haskó *et al.*, 2002; Melin *et al.*, 2007) et aucun



changement pour celles traitées au vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques (McTavish et Sorkin, 1989).

Des études d'expression des gènes VvABCG38-46 et 59-62, 6 h après traitement au MeJA ou au t-resvératrol en comparaison à des cultures non traitées ont été réalisées pour vérifier l'implication de ces gènes dans ces mécanismes de réponse et pour réduire le nombre de candidats. Les analyses par qPCR ont confirmé une forte implication des gènes des ABCG 38, 39, 40 et 42 dans la réponse au MeJA et au resvératrol. Ces 4 gènes ont montré une réponse identique aux deux traitements. Une caractérisation de leurs activités protéiques permettra de déterminer le ou les transporteurs réellement impliqués dans l'excrétion du resvératrol.

Le titre envisagé de l'article est " **Proteomic analysis of changes in plasma membrane proteome of *Vitis labrusca* cv. *Concord* cell suspensions reveals potential proteins involved in resveratrol transport**"

*Publication en preparation*



# **Proteomic analysis of changes in plasma membrane proteome of *Vitis labrusca* cv. *Concord* cell suspensions reveals potential proteins involved in resveratrol transport**

Leo-Paul Tisserant\* <sup>a,b</sup>, Claire Hebrard\* <sup>a</sup>, Gabriel Guihard <sup>a</sup>, Hélène Baraille <sup>a</sup>, Antoine Champagne <sup>c</sup>, Philippe Jeandet <sup>a</sup>, Michèle Boitel <sup>b</sup>, Aziz Aziz <sup>a</sup>, Christophe Clément <sup>a</sup>, Eric Courot <sup>a</sup> and Jérôme Crouzet <sup>a</sup>

\*: co-first authors

a: Université de Reims Champagne Ardenne, URVVC EA 4707, SFR Condorcet FR CNRS 3417, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

b: Université de Picardie Jules Verne, BIOPI EA 3300, SFR Condorcet FR CNRS 3417, UFR des Sciences, Ilot des poulies, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens cedex, France

c: Institut des Sciences de la Vie (ISV), Croix du sud 4-5 BP L7.07.14, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

## Abstract

Resveratrol is a well known phytoalexin found in various plant species such as *Pinus* spp., *Arachis* spp. and *Vitis* spp. In grapevine, a wide range of stilbene presenting different biological and pharmacological activities have been described. For both aspects, the transport of these molecules is crucial, to ensure a proper response of the plant to a pathogen, and because the understanding of the ability of the plant to excrete molecules of interest is also necessary for the optimization of a bioproduction process. Despite the interest shown for resveratrol over the last years, no transporter has yet been described as responsible for the excretion of resveratrol specifically.

Here we describe the changes in plasma membrane proteome of *Vitis labrusca* cell suspension treated with methyljasmonate or resveratrol at 50 and 500  $\mu$ M by using iTRAQ. Resveratrol transporter is likely to be an active transporter induced with production of resveratrol or by resveratrol itself. When comparing to the corresponding expression levels in the control, a total of 155 proteins were found to be regulated by either of these treatments. Amongst them, 7 were identified as AtABCG40-like proteins and were overexpressed. The implication of





ABC transporters in resveratrol excretion has been supported by inhibition assays, showing and inhibition of resveratrol outflow by using glibenclamide, a general ABC transporter inhibitor (Golstein *et al.*, 1999; Haskó *et al.*, 2002; Melin *et al.*, 2007) and no change with verapamil, a Ca<sup>2+</sup> channels inhibitor (McTavish and Sorokin, 1989). Finally, the analysis of gene expression by qPCR was used to further narrow the number of candidates for resveratrol transport.

The analysis of gene expression of proteins from group including *VvABCG38-46* and *59-61*, before and 6h after treatment with MeJA or resveratrol is being conducted to further confirm and narrow the range of candidates. qPCR analysis of specific gene expressions will be conducted to confirm the best candidate for the transport of resveratrol.

**Keywords:** *Vitis vinifera*, ABC transporter, cell suspension, iTRAQ, Stilbene, Resveratrol, UPLC, gene expression

## 1. Introduction

Resveratrol is a secondary metabolite from the phenylpropanoid pathway. It has been widely studied for the last decades due to his implication in plant defense as well as its benefits for human health. Resveratrol has been reported to be anti-aging, anti-carcinogenic, anti-inflammatory, and anti-oxidant properties that may have relevant effect on diseases such as diabetes, Parkinson, or cardiovascular problems. In plants, stilbenes and their main representative, resveratrol, are defense molecules. They have been described as highly inducible by biotic and abiotic stresses such as *Botrytis cinerea* infection (Langcake and McCarthy, 1979), UV on berries (Versari *et al.*, 2001) phytohormones and various elicitors treatments on cell suspensions (see Vuong *et al.* for a review), hairy root cultures (Medina-Bolivar *et al.*, 2007). They are potent antibacterial (Hwang and Lim, 2015), antifungal (Houillé *et al.*, 2014) and also have free radical scavenging activity (Khanduja and Bhardwaj, 2003). Stilbenes have been reported to occur in various unrelated plant species (Jang *et al.*, 1997). Amongst them, *Arachis hypogea*, *Pinus spp.* and *Vitis spp.* are the most studied. Resveratrol is produced from coumaric acid, which is coupled with a CoA by the 4CL enzyme before being converted to resveratrol by the STS using 3 malonyl-CoA. This pathway in particularly developed in *Vitis spp.*, with more than 30 stilbene synthase (STS) genes



(Parage *et al.*, 2012), and a wide range of resveratrol derivatives (Rivière *et al.*, 2012). This amplification suggests a complex regulation and the capital importance of stilbenes for the plant.

To insure their function, secondary metabolites such as stilbene need to be precisely targeted to the accurate compartment through membranes. Several studies have proposed various mechanisms to transport secondary metabolites such as simple diffusion, vesicle-mediated transport and membrane transporters (Shitan, 2016). The two major active transport mechanisms are ion gradient-dependant transporter also called secondary transporters, composed of symporters and antiporters, and ATP-dependant transport with the ATB-binding cassette (ABC) transporters also called primary transporters. The main characterized families are the MATE (multidrug and toxic compound extrusion) and the ABC transporters (Shoji, 2014). See Shitan (2016) for a review. Reports have shown that MATE transporters, H<sup>+</sup> gradient dependant transporters, such as AtFFT or AtTT12 were involved in flavonoid (Kitamura *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2010a, 2010b) or proanthocyanidin/H<sup>+</sup> (Debeaujon *et al.*, 2001; Marinova *et al.*, 2007; Zhao and Dixon, 2009) exchange respectively. Plant ABC transporters constitute a large family of transporters, divided in 8 families in plants: ABC A to G and I (Kang *et al.*, 2011). They were first described as involved in the final detoxification process (Martinoia *et al.*, 1993) but were then shown to be involved in many other capital processes for the plant, including pathogen response (Kang *et al.*, 2011). AtABCG29 and AtABCG 37 have for example been reported to be involved in the excretion of monolignol (Alejandro *et al.*, 2012) and scopoletin (Fourcroy *et al.*, 2014) respectively. Transporters expressions are often regulated together with the expression of other genes involved in the same pathway (Shitan, 2016). Another regulation for transporters can occur with their own substrate, such as sugar transporters in *Vitis vinifera* (Conde *et al.*, 2006) or sclareol transporter SpTUR2 (Van Den Brûle and Smart, 2002), upregulated by their substrate. There is some evidence suggesting of transport of resveratrol out of grapevine cells cultured in suspensions (Jeandet *et al.* 2016), secreted by organs such as leaves induced by UV treatment (Blaich and Bachmann, 1980) or elicited hairy roots of peanut and muscadine (Medina-Bolivar *et al.*, 2007; Nopo-Olazabal *et al.*, 2013) as well as between organs, in conducting vessels (Houillé *et al.*, 2015; Poutaraud *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). These findings were supported by fluorescence microscopy measurements, showing stilbene synthase (STS) localized near the plasma membrane when elicited (Fornara *et al.*, 2008). Although resveratrol excretion mechanism is of significant importance in biotechnology, it is still mostly unknown. Proteomics methods have greatly evolved through the past decades and have become a

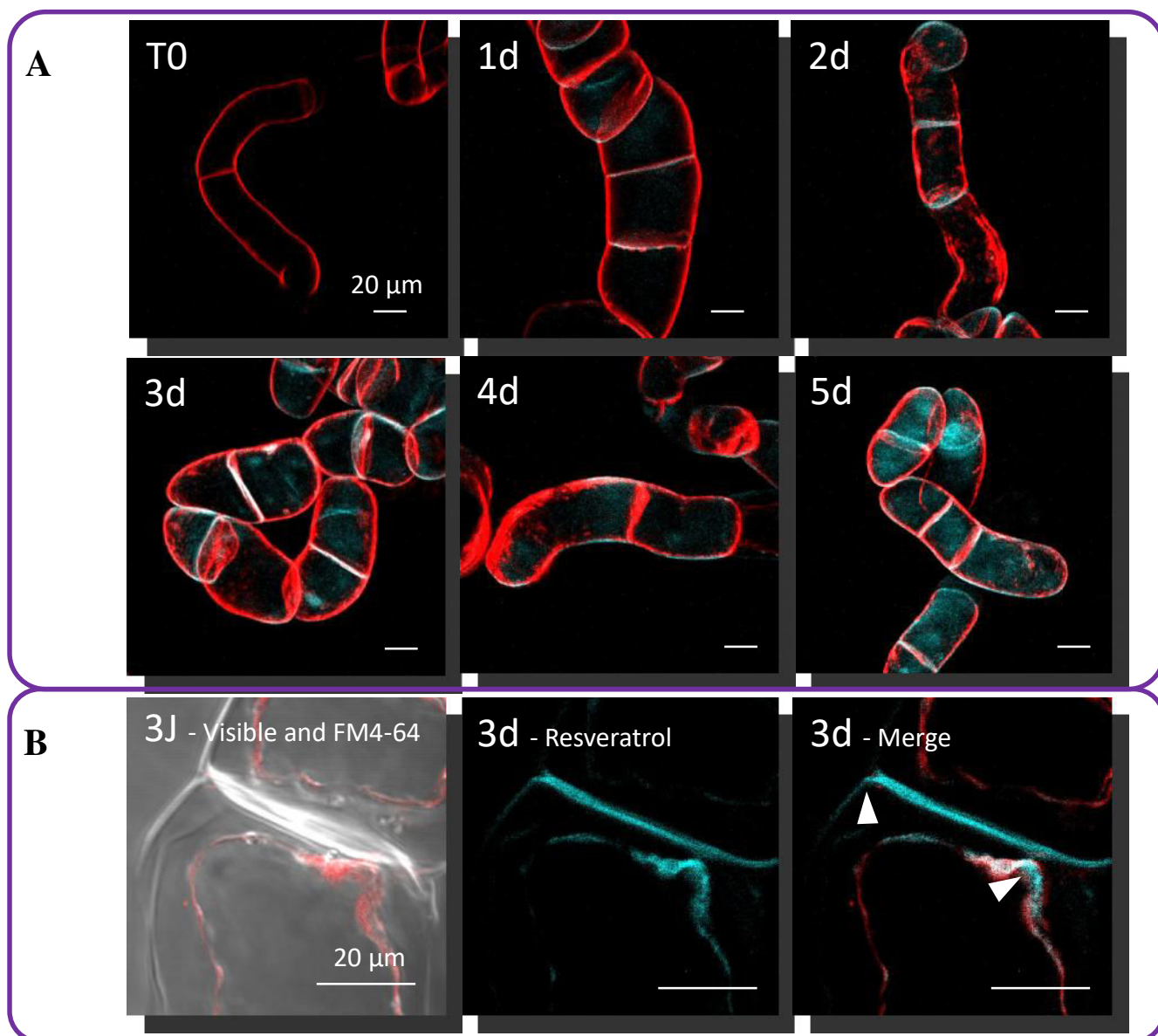


Figure 1: Subcellular localization of resveratrol after 500µM MeJA treatment. Red: FM4-64 staining of plasma membrane, Cyan: autofluorescence of resveratrol. A: Resveratrol production kinetics, 20x Objective. B: Detail of a plasmolysed cell, white arrows show the intracellular and cell wall localization of resveratrol, 63x Objective. White bar represents 20 µm.

powerful tool to reveal protein involved in responses of plants to various treatments or different conditions. The use of isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ™) allows to overcome limitations met by previous methods such as the difficulty to analyze membrane proteins in difference gel electrophoresis (DIGE) and allows the analysis of multiple 4-8 samples together (4-plex and 8-plex). Together with metabolomics, and/or transcriptomics, the analysis of transmembrane proteins or membrane-associated proteins enables the study of yet poorly known transport mechanisms and regulation. Recently many groups of co-regulated proteins including transporters were identified using such methods. For example, 5 transporters involved in NaCl and NaHCO<sub>3</sub> stress response were identified in tomato roots (Gong *et al.*, 2014), several transporters, including an ABC transporter, were also identified by comparing anthers from a photosensitive male sterile cotton mutant to wild type (Liu *et al.*, 2014). The effect of methyl jasmonate and methylcyclodextrines on the proteome and extracellular proteome (Martinez-Esteso *et al.*, 2009, 2011) grapevine cell suspensions of Gamay have been tested previously, showing an upregulation of genes involved in resveratrol biosynthesis pathway, Glutathion S-Transferases (GST) involved in vacuolar transport of resveratrol amongst with genes involved in defense response and growth inhibition. In the same conditions, they showed the presence of secretory peroxidases in the extracellular compartment.

Still little is known of the biosynthesis of resveratrol derivatives, their regulation and their transport. The understanding of these aspects would offer a better understanding of plant defense mechanisms and enable further optimization of current production systems. In this study, we compare the membrane enriched proteomes of grapevine *Vitis labrusca* cv Concord cell suspension treated with resveratrol or Methyl Jasmonate (MeJA) to non-treated control cultures using iTRAQ protein labeling technology. This is the first time resveratrol is used to induce its own transporter. Inhibition assays were done to verify our hypothesis and the best candidate was further tested by RT-qPCR to confirm its implication in resveratrol metabolism.

## 2. Results and Discussion

### 2.1 Resveratrol subcellular localization

Confocal microscopy observations confirmed the accumulation of resveratrol over time after MeJA treatment (figure 1A). FM4-64 staining was used to color the plasma membrane and

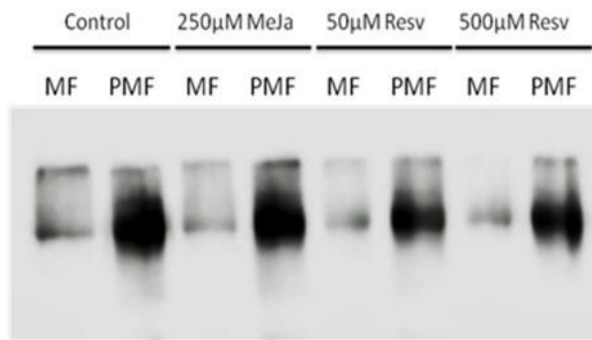


Figure 2: Verification of plasma membrane protein enrichment by Western blot analysis of Membrane fractions (MF) and enriched Plasma Membrane Fractions (PMF) for each treatment. Detection was done using anti H<sup>+</sup>ATPase antibodies.

	<b>Total</b>	<b>PM proteins</b>	<b>PM and Regulated</b>
<b>Rep 1</b>	1171	477	29
<b>Rep 2</b>	1144	506	80
<b>Rep 3</b>	1584	612	46

Table 1: Number of proteins total detected in each repetition, associated to the plasma membrane and those associated to the plasma membrane and regulated.

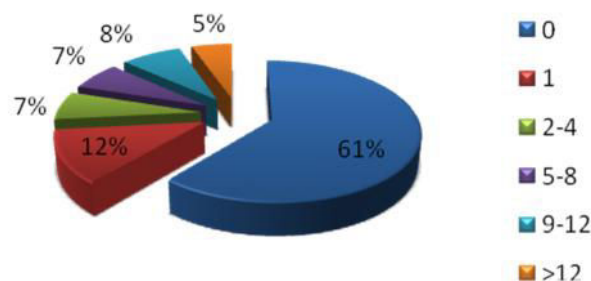


Figure 3: Number of TMD of the PM proteins from all 3 repetitions.

thus locate the accumulation of resveratrol on either side. Figure 1B shows that resveratrol is present both in the intracellular compartment and in the cell wall. Resveratrol is probably retained in the cell wall due to its high affinity for cellulose.

## 2.2 Proteomic profiles changes upon MeJA or resveratrol treatments

Prior to iTRAQ analysis, the total membrane protein extracts from each treatment were enriched in plasma membrane proteins. The enrichment was verified by western blot analysis using anti-H<sup>+</sup>ATPase antibodies as a marker of plasma membrane (figure 2). The analysis of our plasma membrane-enriched protein sample showed that 55-62% of detected proteins are not described as located at the plasma membrane (table 1). As the enrichment protocol used does not guarantee comparable amounts in contaminant proteins, only those explicitly described in GO as present at the plasma membrane were considered.

The number of transmembrane domains (TMD) in plasma membrane-associated proteins was predicted using THMHMM analysis (figure 3). 61% of the plasma membrane proteins are associated to the membrane or associated with plasma membrane proteins as they do not have a TMD. Proteins detected with few TMD are probably associated to the membrane. Only 8 % and 5 % count from 9-12 TMD or more than 12 respectively. These proteins constitute the most promising candidates for the transport of resveratrol as transmembrane transport proteins often count many TMDs, allowing them the formation of channels through the membrane. Of course the presence of contaminants from other cell compartments cannot be ignored.

Amongst the proteins located at the plasma membrane, we chose the 5% that were the most up regulated and the 5% most down-regulated proteins (table 1). The gene ontology information of total PM proteins and regulated PM proteins was compared for the different treatments applied (figure 3). Protein binding PM proteins were found to be underrepresented in MeJA treated cells (figure 4 A). Proteins with activity excluding hydrolase, kinase and transferase activities (“other enzyme activity”) and transporter activity proteins were found overrepresented amongst proteins up-regulated with MeJA and 50  $\mu$ M resveratrol treatments respectively. Interestingly, it is resveratrol at 50  $\mu$ M that shows the clearest effect of the proportion of up-regulated transporter proteins. This suggests the activation of numerous transporters by resveratrol. An inhibition of proteins from other categories by resveratrol is also possible although no significant differences were observed.

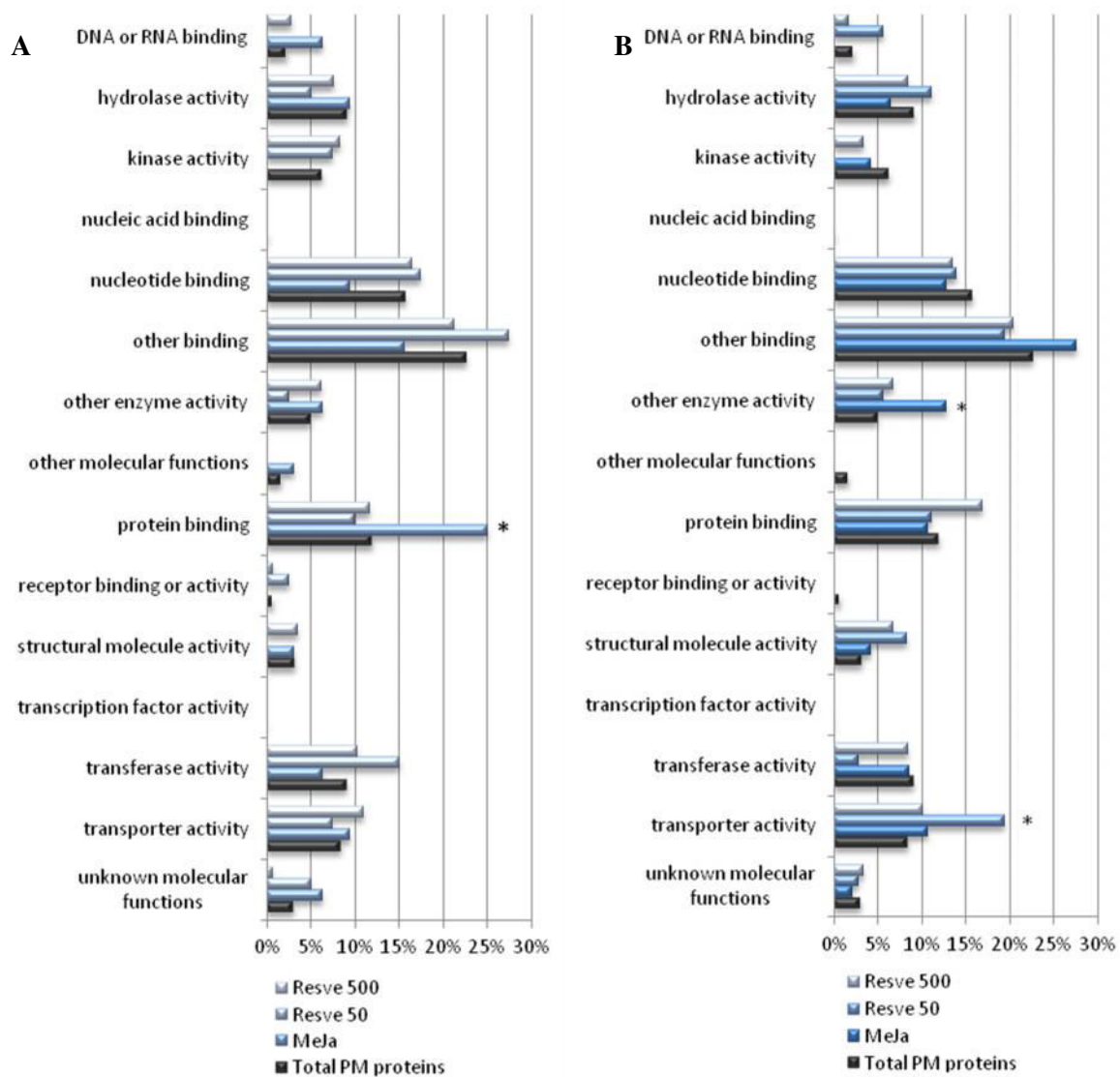


Figure 4: Proportion of proteins from each GO annotation for PM protein. **A:** Down-regulated PM proteins, **B:** Up-regulated PM proteins. All GO information was retrieved from TAIR. Stars represent significance level of Z-test on proportions ( $p < 0.05$ ).



The log<sub>2</sub>-transformed expression levels of regulated PM proteins were classified using Hierarchical Clustering Analysis (HCA) (figure 5). Expression profiles in response to different treatments applied were classified in 9 groups (Supplemental data S1).

### 2.3 Transporters

Amongst the strongly up-regulated proteins from the plasma membrane, we investigated which could be involved in the transport of polyphenolic compounds. Many ABCG-like proteins as well as one ABCC-like protein were found to be up regulated by MeJA, resveratrol at 50  $\mu$ M and/or resveratrol at 500 $\mu$ M. Two were found in group 9 (figure 5), 1 in group 6, 2 in group 5 and 2 in group 4. All of those ABCG-like-proteins were shown as close to AtABCG40 transporter (figure 6). This suggests that the best candidates for resveratrol transports are in groups VvABCG38 to 46 and ABCG59 to 62. AtABCG 34 and 39-like proteins were detected in iTRAQ but were shown as non-regulated. One AtABCC4-like protein was also up-regulated but as ABCC transporters have often been described as responsible for vacuolar transport (Nagy *et al.*, 2009; Rea, 2007), it was not further investigated for now.

### 2.4 Inhibition assays

Specific inhibitors were used to test the implication of ABC transporters of Ca<sup>2+</sup> channels in resveratrol excretion. The cell suspensions elicited with 250 $\mu$ M MeJA were treated using 100  $\mu$ M Verapamil, a Ca<sup>2+</sup> channels inhibitor (McTavish and Sorkin, 1989), or 50  $\mu$ M glibenclamide, a general ABC transporter inhibitor (Golstein *et al.*, 1999; Haskó *et al.*, 2002; Melin *et al.*, 2007). Glibenclamide showed a significant diminution in resveratrol concentration measured in the culture medium (figure 7 A), whereas Verapamil treatment showed no change in excreted resveratrol, suggesting the implication of ABC transporters in resveratrol excretion, and that the interference with Ca<sup>2+</sup> signaling involved in the standard response to MeJA is not sufficient to affect resveratrol transport. The resveratrol concentration measured in cells (figure 7 B) does not show significant changes for verapamil treated cells or for control cells but show a moderate accumulation of resveratrol in glibenclamide treated cells. These observations support the implication of ABC transport in the excretion of resveratrol in the culture medium.

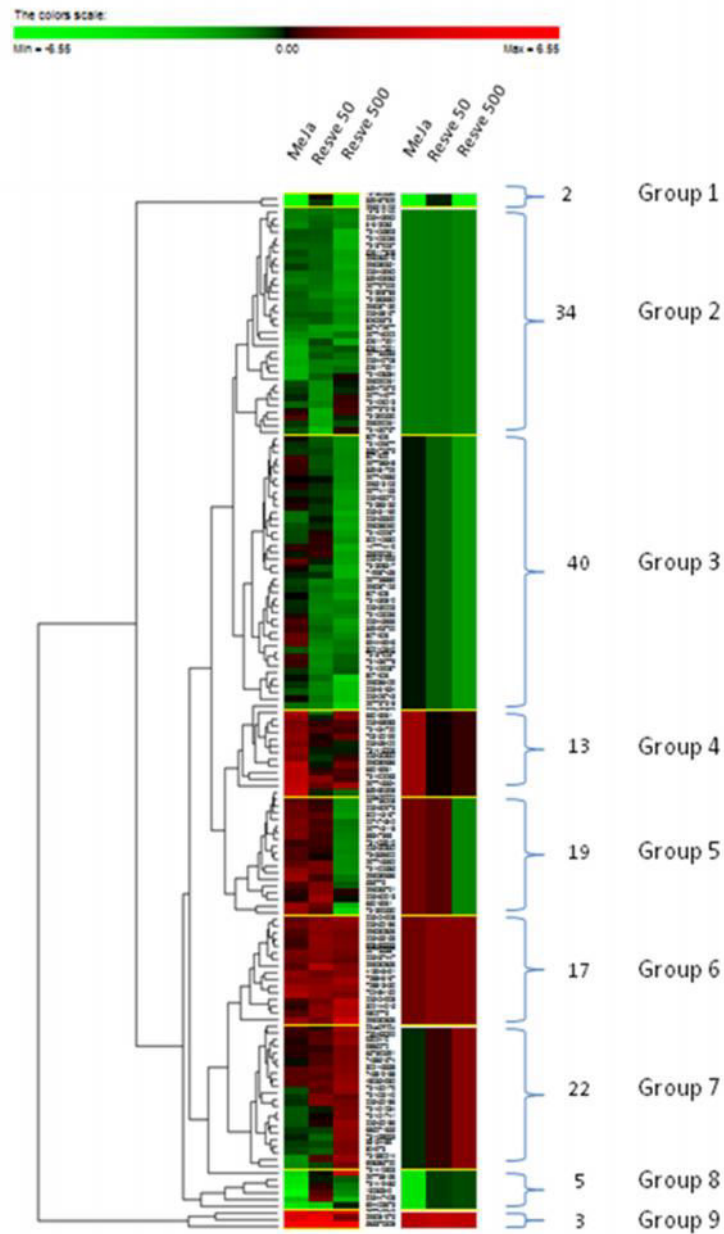


Figure 5: Hierarchical Clustering of the 155 proteins located at the plasma membrane and regulated. Results are shown as log<sub>2</sub> of the expression values to obtain a normal distribution. The average profile and number of proteins in each cluster is shown on the right.

## 2.5 Gene expression

The expression of *Vitis vinifera* ABC transporters having protein sequences close to *AtABCG40* was investigated 0 and 6h after treatment using quantitative RT-PCR. Due to the very high homology between VvABCG transporters (figure 8), the design of specific primers for each candidate is challenging. To further narrow the candidates for resveratrol transport, primers specific to major groups of candidates were designed (figure 9A).

The analysis of gene group expressions (figure 9B) showed that genes from groups 1 and 2, homologous to up-regulated *AtABCG40*-like proteins are also up-regulated by MeJA and resveratrol to a lesser extent. Group 2 shows a very strong response to both treatments and thus comprises the most promising candidates for resveratrol transport. The gene expression of group 3 genes shows no change in response to MeJA or resveratrol. Interestingly, the genes present in group 4, homologous to *AtABCG 34* and *39*, show a rise in expression following our treatments whereas no change in protein were detected using iTRAQ. This could suggest a post transcriptional regulation.

Group 2 was further investigated using specific primers (figure 9C). No differences in expression levels were found between those 4 genes. Major future challenge will consist in further narrowing these candidates, characterizing these transporters and confirm their role *in planta*. Altogether, these results point out VvABCG 38, 39, 40 and 42 as reliable candidates for the transport of resveratrol.

## 3. Conclusion

This study assessed plasma membrane proteomic changes in Concord cell suspensions induced with MeJA and resveratrol. *De novo* synthesis of specific ABCG transporters in these conditions suggests the implication of at least one ABCG transporter in resveratrol transport. Our results also show that resveratrol treatment of Concord cell suspension is capable of inducing the production of its own transporter. This hypothesis is supported by the fact that glibenclamide, a general ABC transporter inhibitor inhibits resveratrol release in the culture media, and by the overexpression of the corresponding genes within hours after treatment.

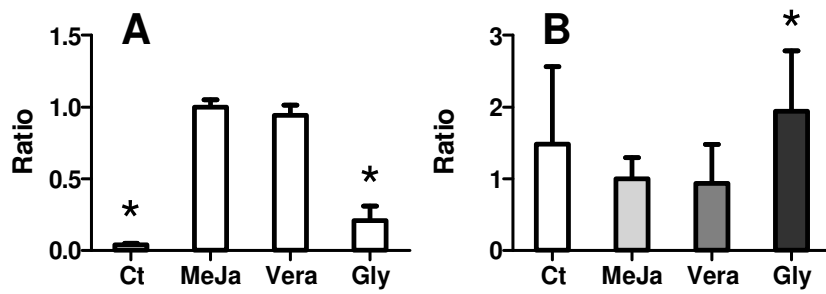


Figure 7: Ratio of resveratrol measured in the culture medium (A) compared to MeJA treated culture (B). Each plot represents means and standard deviation of 3 independent experiments with 3 biological replicates. Results were considered significantly different from MeJA treated cultures when p value from t-test was  $<0.05$ .

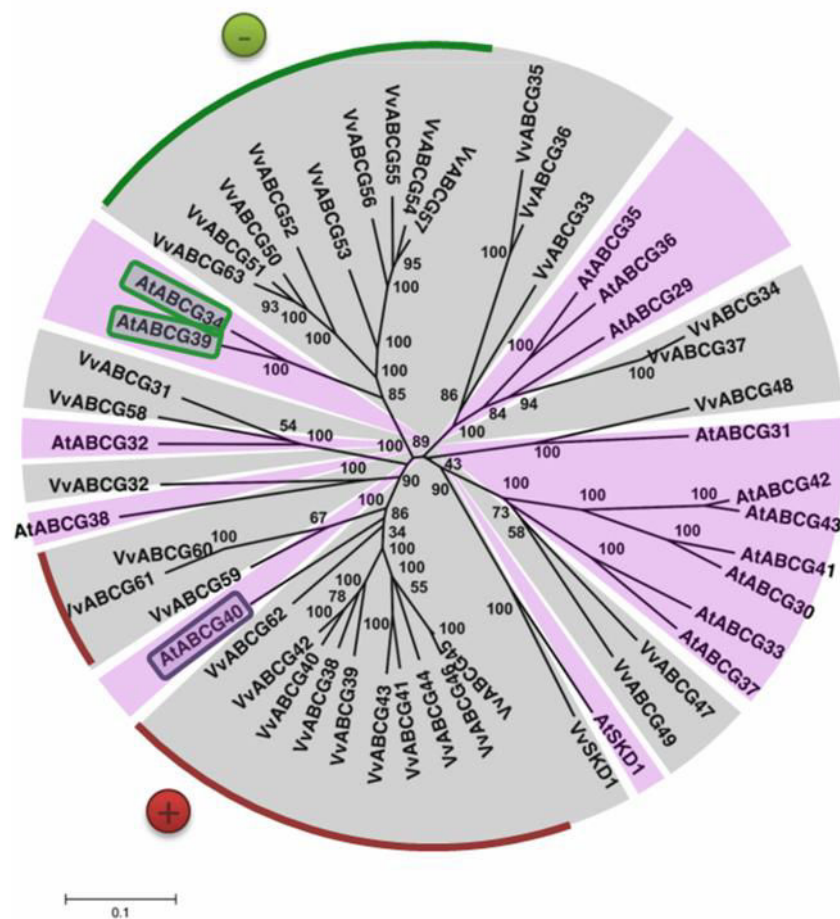


Figure 8: Phylogenetic tree of ABCG protein sequences from *Arabidopsis* (purple) and *Vitis vinifera* (grey). Purple rectangle: AtABCG40, Red line: all VvABCG showing high similarity with AtABCG40, Green rectangles: AtABCG34 and 39, Green line: all VvABCG showing high similarity with AtABCG34 and 39. Adapted from Çakır and Kılıçkaya (2013).

## 4. Experimental

### 4.1 Plant material and growth conditions

Stock cell suspension cultures derived from Concord grapevine variety (*Vitis labrusca*) were maintained in Erlenmeyer flask of 300 mL containing 100 mL of a modified Gamborg B5 liquid culture medium (Gamborg *et al.*, 1968) supplemented with sucrose (30 g/L), 1-naphthaleneacetic acid (NAA; 0.1 mg/L) and kinetin (0.2 mg/L) at pH 5.8. Cell suspensions were cultured in darkness at 23°C on a rotary shaker at 110 rpm and routinely subcultured every week into fresh medium at a 33% (v/v) rate.

### 4.2 Chemicals

Methyljasmonate (MeJA) and all other compounds used in this study were ordered from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### 4.3 Confocal microscopy

Observations were made everyday up to 6 day after induction. on cell suspensions treated with 500  $\mu$ M MeJA or non-treated. An LSM 710 NLO Zeiss (Jena, Germany) confocal microscope was used. Light source was a pulsed Titanium-Sapphire CHAMELEON lazer (Coherent, Santa Clara, USA), set at 715 nm and a 5% power, as described by Donnez (2010). The observations were made on live cells with 1:4000 FM4-64 dye added directly in the culture medium. The emitted fluorescence was measured for the bandwidth of 370 – 450 nm. 3D reconstructions and have been made using ImageJ software (Schneider *et al.* 2012).

### 4.4 Treatment of suspension cell culture for iTRAQ analysis

Seven-day old cells were diluted into fresh medium at a 40% (v/v) rate (approximately 25 g of cells) and transferred to 500 mL flasks (200 mL/flask). After four days of culture, MeJA or resveratrol solubilised in ethanol was added to the flasks to give a final concentration of 250  $\mu$ M for MeJA and 50  $\mu$ M or 500  $\mu$ M for resveratrol. Negative control received 1 mL of

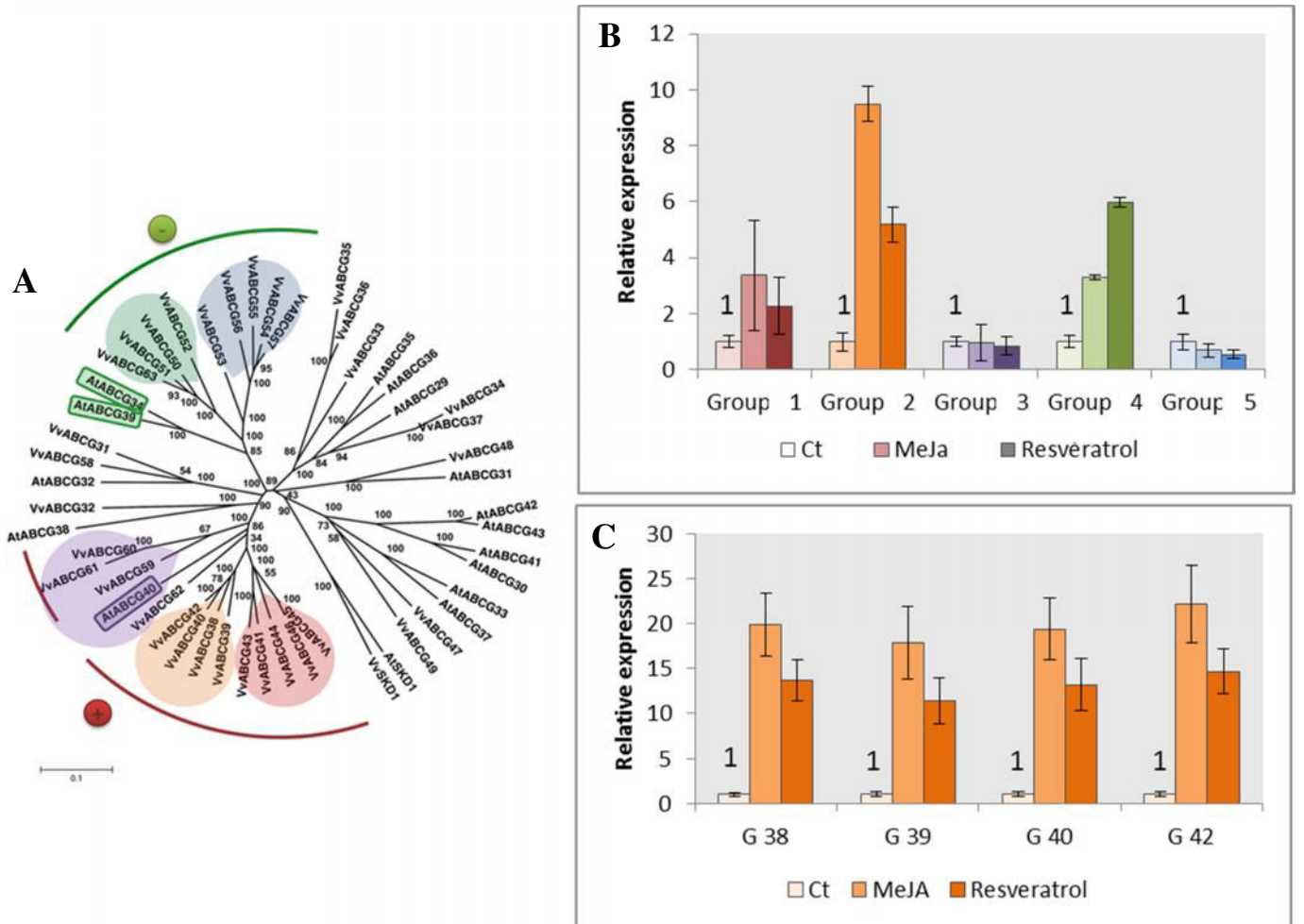


Figure 9: Relative gene expression of MeJA and Resveratrol treated cultures compared to control. A: groups of genes tested by qPCR, B: results of gene groups amplifications, C: specific targets amplifications

ethanol (i.e. 0.1% v/v). Ethanol did not affect secondary metabolites production or cell viability at this concentration. After a 24 h incubation period, biomass was separated from the medium culture by filtration, rinsed with a wash buffer (2 mM EDTA, 0.15 % KCl, pH 8.0), frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80°C until use.

#### 4.5 Plasma membrane preparation

For each treatment, 25 g of frozen cells were ground with liquid N<sub>2</sub> in a mill and resuspended in 50 mL of homogenization buffer (250 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 6 g/L polyvinylpyrrolidone, 5 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, X protease inhibitor cocktail). The mixture was homogenized 10 times in a 50 mL potter and then centrifuged at 3200 g for 5 min at 4°C. The supernatant was collected and centrifuged at 6300 g for 5 min at 4°C. Again, the supernatant was collected and centrifuged at 108800 g for 1 h at 4°C. The obtained pellet, containing the microsomal fraction, was suspended in 2 mL of buffer II (5 mM potassium phosphate, 330 mM sucrose, 3 mM potassium chloride, pH 7.8, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitor cocktail) and homogenized 10 times in a 5 mL potter. Plasma membranes were purified from microsomal fraction by partitioning in an aqueous two-phase system (6.75 g of phase mixture), as described by Larsson *et al.*, (1987), suspended in 100 µL of buffer III (330 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8) and homogenized 10 times in a 0.1 mL potter. Total protein was determined by Bradford reagent using BSA as standard.

Western blot analysis was used to verify the PM proteins enrichment. Membrane Fractions were compared to PM Fractions using rabbit anti H<sup>+</sup>ATPase primary antibodies and anti rabbit secondary antibodies.

#### 4.6 iTRAQ experiment

##### **Reduction/Alkylation/Digestion/iTRAQ-Labeling**

Proteins were resuspended in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> containing 0.1% RapiGest (Waters) by vortexing at room temperature for 30 min. Disulfide bonds were reduced in 25 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine for 1 h at 60 °C; then, cysteine residues were blocked in 200 mM methyl methanethiosulfonate for 15 min at room temperature under dark light conditions. The proteins were then subjected to tryptic digestion (sequencing-grade-modified trypsin,





Promega) at a protease/protein ratio of 1/20 (w/w) at 37 °C for 16 h. RapiGest lysis was performed by the addition of trifluoroacetic acid (TFA, 1% final concentration), incubation of the samples for 1 h at 37 °C, and centrifugation at 130 000g for 45 min at 4 °C. The supernatant was collected and vacuum-dried (SpeedVac SC 200, Savant). The 8-plex iTRAQ labeling was performed using the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The samples were labeled with tags 114, 115, 116 or 117 for control, MeJA, 50 µM resveratrol and 500 µM resveratrol respectively.

### **Online MudPIT Separation**

Three hundred micrograms of peptides were solubilized in loading buffer (2% ACN, 1% TFA) and analyzed using a multidimensional protein identification technology (MudPIT) approach that has been previously described. The eluted fractions (10 × 360) were then spotted onto two MALDI plates with ionization matrix (4 mg·mL<sup>-1</sup> of *o*-cyano-4-hydroxycinnamic acid, 70% ACN, 0.1% TFA, 10 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) using a Probot (LC Packings).

### **MALDI-MS/MS and Database Search Analysis**

Mass spectrometry analyses were performed on an Applied Biosystems 4800 MALDI time-of-flight (TOF)/TOF analyzer using a 200 Hz solid-state laser operating at 355 nm. MS spectra were obtained using a laser intensity of 3200 and 1500 laser shots per spot in the *m/z* range of 800 to 4000, whereas MS/MS spectra were obtained by automatic selection of the 15 most intense precursor ions per spot using a laser intensity of 3800 and 3000 laser shots per precursor. Collision-induced dissociation was performed with an energy of 1 kV with air as the collision gas at a pressure of 1 × 10<sup>-6</sup> Torr. The MS data were used to search the Viridiplantae part of the whole NCBI nr database (from the National Center for Biotechnology Information Web site) and the ProteinPilot software (v.4.0.8085, AB Sciex). Protein identification was based on the Paragon algorithm v.4.0. algorithm in ProteinPilot was used with “iTRAQ quantification” as the sample type, “MMTS” as the cysteine modification, “4800 TOF/TOF” as the instrument, and the “Thorough” preset search setting. All reported proteins were identified with 95% or greater confidence, as determined by ProteinPilot unused scores (>1.3). This corresponds to a stringent threshold of false discovery rate, that is, lower than 1%. Protein grouping performed by ProteinPilot removed redundant hits. The Pro Group algorithm creates groups of identified proteins that share part of their spectra and thus of their sequence, which is typically the case for proteins belonging to the same family. Proteins with



insufficient score for identification but not for quantification were not quantified by the Protein Pilot software (AB Sciex). For instance, shared peptides are not used for quantification. We use the term “protein” in the text when referring to “group of identified proteins” made by the software.

### **Statistical Analysis**

All of the analyses and calculations were performed using SAS version 9.3 (SAS Institute). The iTRAQ quantitative ratios from the TGT and SGT samples were compared using the generalized linear model (GLM) procedure to perform a two way ANOVA on the data from both sample types. The two factors were the sample means and the proteins. Taking into account the positive interaction between the two factors, the global analysis was then sliced into subanalyses.

### **4.7 Data analysis**

As many detected proteins were unknown or poorly annotated, their sequences were aligned with *Arabidopsis thaliana* protein sequences to obtain information on the family and possible localization. Gene Ontology was retrieved from TAIR. For protein described as present at the plasma membrane, expression data was log<sub>2</sub> converted to obtain a normal distribution and proteins whose expression fell outside the 95% around the median were considered as significantly up or down regulated, setting the thresholds values to 1.97 and 0.46 respectively. Due to the very high similarity between the transporter candidates, the protein expressions were not averaged to avoid miss-associations. The prediction of the number of transmembrane domains was done using the TMHMM program (Krogh *et al.*, 2001).

Data from regulated PM proteins were imported into the PermutMatrix version 1.9.3 software (LIRMM, Montpellier, France) for clustering analysis on log<sub>2</sub> expression data. The classification was done on the rows only, using the Euclidian to measure the proximity between samples and the McQuitty (WPGMA) method was applied sort the data. The resulting dendrogram allowed us to classify the expression data in 9 groups showing different responses to the treatment applied.

Peptides sequences from ABCG –like proteins were then aligned specifically with VvABCG proteins to reduce the number of candidates for gene expression analysis.



## 4.8 Transport inhibitor experiments

For inhibitor experiments, 7-day old cells were diluted into fresh medium at a 20% (v/v) rate, transferred to 100 mL flasks (33 mL/flask) and cultured for four days. Prior to the addition of MeJA (final concentration 250  $\mu$ M), cultures were treated with transport inhibitors for 1 h. Stock solutions of verapamil and glibenclamide were dissolved in DMSO. A maximum of 33  $\mu$ L (i.e. 0.1% v/v) of each solution was added to cultures to reach concentrations of 100  $\mu$ M verapamil and 50  $\mu$ M glibenclamide. Negative controls received 33  $\mu$ L of each solvent. Ethanol, DMSO or transport inhibitors did not affect secondary metabolites production or cell viability at the used concentrations. The viability of the cells was tested by staining with fluorescein diacetate (FDA) according to Widholm (1972). After a 24 h incubation period, the resveratrol content in the medium culture was analyzed by UPLC.

## 4.9 Resveratrol analysis

Resveratrol extraction was done adapted from (Gruau *et al.*, 2015), briefly, culture medium and cells were separated. 1.5 ml culture medium was extracted once with AcOEt (v/v) evaporated and resuspended in 1 ml MeOH. Cells extracts were obtained by 2h in 3ml 85% MeOH followed by 1h 100% in 3 ml MeOH extraction. Both supernatants were pooled, evaporated and resuspended in MeOH with 1ml per g cells. Extracts were filtered through a PTFE 0.45  $\mu$ m filter (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois, France) before analysis. Stilbenes were analyzed using an Acquity UPLC system (Waters, Guyancourt, France) with an C18 Cortecs® (Waters) column (2.1 x 100 mm, particles: 1.6  $\mu$ m, pore size: 90 Å) heated at 30 °C. Resveratrol was eluted with a mixture of water (A) and pure acetonitrile (B) at a flow rate of 0.5ml min<sup>-1</sup> according to the following gradient: initial, 90% A; 5min, 10% A; 5.5min, 0% A; 6min, 0% A; 6.5min, 90% A and 7min, 90% A. Fluorescence was measured with an excitation wavelength of 330nm and an emission wavelength of 375nm using an Acquity fluorimeter (Waters). Resveratrol was quantified after calibration with external standard (Sigma-Aldrich, France).

The results are expressed as a ratio of the resveratrol concentration measured in the different treatments over those measured for methyl jasmonate-treated cells.

Table 2: Primer sequences used for qPCR analysis.

	Target		Sequence (5'->3')
Specific primers	ABC-G38S	F	TCTGGGCACCAAAAGGACA
		R	TGTGCAAAGACATAAGGAATCTCAA
	ABC-G39S	F	TGGTAAAAGTTGCCGAAGAGGA
		R	TTGGAAGAATACGCACAGCG
	ABC-G40S	F	CCTCGTGAAGATGTGGTTGAATTTT
		R	ATCAAATGGCGATGCAAGCTC
	ABC-G42S	F	ACAGTCAGAAACACAGTGGAC
		R	TCAGTGAAATCTACCCCAAAG
	ABC-G50S	F	AGCAGGTGTTGAGCAATGGA
		R	CCATTACACCCTCAACGGCA
	ABC-G51S	F	CAGTGCAACCTGTTGTGGC
		R	CATCCCGTACAGTGAGAAGTAGG
ABC-G52S	F	AGAGCCAATGGGTAAAAGAGGA	
	R	TATGCTTCCTTCAATATACCCACCA	
ABC-G53S	F	GGGCCGCTCCTAATACAGAC	
	R	CTTCAGTGCTGTGCTGTCCA	
ABC-G60S	F	TTCGCTGAAGCGTTTCAATCAT	
	R	CATGGGAAGCTCTGTGAATCC	
ABC-G61S	F	AGCAAAGGGCCTTCTCTTC	
	R	ATCCACCCAAAACCACTACTAGA	
ABC-G62S	F	TGTATTCAGCTTCCCATATGCC	
	R	TGGAATCCTTGTGTGAGGAATGA	
Group primers	Group 1	F	GCATTCTCTGCAAGATGCCAG
		R	CCCTTATCATCTCATCTCCTACC
	Group 2	F	AAAGCTTGATTCCAGTCTAAAGGT
		R	GGCCAAGGTTTCCCGTACA
	Group 3	F	GAGAGGTTACCGACCTACGAT
R		AGAAACCTCTCGTTATCATCCTCA	
Group 4	F	TTGAGCTTACCCCTGAG	
	R	ACAACAGTCCGCCCTGTATC	
Group 5	F	AGGGGTTCTTGAATTATCTTCACA	
	R	TCCTCTGTGGAACAAACTCATCC	

## 4.10 Gene expression

Group primers were designed by targeting specifically conserved regions in each group (figure 5): group 1: ABCG38, 39, 40 and 42, group 2: ABCG 41, 43, 44, 45, and 46, group 3: 50, 51, 52 and 63, group 4: ABCG54, 55, 56, and 57 and group 5: ABCG59 and 60. VvABCG 53 and 62 were excluded and tested specifically due to their important differences compared to other members of their groups, which limited the amount of group-specific sequences. Primer sequences are given in table 2.

## 5. Acknowledgements

The work described in this paper was supported by a grant from Région Champagne-Ardenne (France).

## References

- Alejandro, S., Lee, Y., Tohge, T., Sudre, D., Osorio, S., Park, J., Bovet, L., Lee, Y., Geldner, N., Fernie, A.R., Martinoia, E. (2012). AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr. Biol.* 22, 1207–1212.
- Blaich, R. Bachmann, O. (1980). The resveratrol synthesis in *Vitaceae* induction and cytological observations. *Vitis* 19, 230–240.
- Çakır, B. Kılıçkaya, O. (2013). Whole-genome survey of the putative ATP-binding cassette transporter family genes in *Vitis vinifera*. *PLoS ONE* 8, e78860.
- Conde, C., Agasse, A., Glissant, D., Tavares, R., Gerós, H. Delrot, S. (2006). Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiol.* 141, 1563–1577.
- Debeaujon, I., Peeters, A.J.M., Léon-Kloosterziel, K.M. Koornneef, M. (2001). The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* 13, 853–871.





Fornara, V., Onelli, E., Sparvoli, F., Rossoni, M., Aina, R., Marino, G. Citterio, S. (2008). Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma* 233, 83–93.

Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Reyt, G., Gaymard, F., Abadía, A., Abadia, J., Álvarez-Fernández, A. Briat, J.-F. (2014). Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* 201, 155–167.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151–158.

Golstein, P.E., Boom, A., Geffel, J. van, Jacobs, P., Masereel, B. Beauwens, R. (1999). P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflug. Arch.* 437, 652–660.

Gong, B., Zhang, C., Li, X., Wen, D., Wang, S., Shi, Q. Wang, X. (2014). Identification of NaCl and NaHCO<sub>3</sub> stress responsive proteins in tomato roots using iTRAQ-based analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 417–422.

Gruau, C., Trotel-Aziz, P., Villaume, S., Rabenoelina, F., Clément, C., Baillieul, F. Aziz, A. (2015). *Pseudomonas fluorescens* PTA-CT2 triggers local and systemic immune response against *Botrytis cinerea* in grapevine. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 1117–1129.

Haskó, G., Deitch, E.A., Németh, Z.H., Kuhel, D.G. Szabó, C. (2002). Inhibitors of ATP-binding cassette transporters suppress interleukin-12 p40 production and major histocompatibility complex ii up-regulation in macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 103–110.

Houillé, B., Papon, N., Boudesocque, L., Bourdeaud, E., Besseau, S., Courdavault, V., Enguehard-Gueiffier, C., Delanoue, G., Guérin, L., Bouchara, J.-P., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., Guillard, J., Lanoue, A. (2014). Antifungal activity of resveratrol derivatives against *Candida species*. *J. Nat. Prod.* 77, 1658–1662.

Houillé, B., Besseau, S., Delanoue, G., Oudin, A., Papon, N., Clastre, M., Simkin, A.J., Guérin, L., Courdavault, V., Giglioli-Guivarc'h, N., Lanoue, A. (2015). Composition and tissue-specific distribution of stilbenoids in grape canes are affected by downy mildew pressure in the vineyard. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8472–8477.



- Hwang, D. Lim, Y.-H. (2015). Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of *FtsZ* expression. *Sci. Rep.*, vol. 5, 10029.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M.. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218–220.
- Jeandet, P., Clément, C., Tisserant, L.-P., Crouzet, J. Courot, É. (2016). Use of grapevine cell cultures for the production of phytoestrogens of cosmetic interest. *Comptes Rendus Chim.* doi:10.1016/j.crci.2016.02.013
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y. Martinoia, E. (2011). Plant ABC transporters. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 9. doi: 10.1199/tab.0153
- Khanduja, K.L. Bhardwaj, A. (2003). Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared *in vitro* with some other bioflavonoids. *Indian J. Biochem. Biophys.* 40, 416–422.
- Kitamura, S., Oono, Y. Narumi, I. (2015). *Arabidopsis pab1*, a mutant with reduced anthocyanins in immature seeds from banyuls, harbors a mutation in the MATE transporter FFT. *Plant Mol. Biol.* 90, 7–18.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. Sonnhammer, E.L.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes1. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580.
- Langcake, P. McCarthy, W.V. (1979). The relationship between resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18, 244–253.
- Larsson, C., Widell, S. Kjellbom, P. (1987). [52] Preparation of high-purity plasma membranes. B.-M. in *Enzymology*, ed. (Academic Press), 558–568.
- Liu, G.-T., Ma, L., Duan, W., Wang, B.-C., Li, J.-H., Xu, H.-G., Yan, X.-Q., Yan, B.-F., Li, S.-H. Wang, L.-J. (2014). Differential proteomic analysis of grapevine leaves by iTRAQ reveals responses to heat stress and subsequent recovery. *BMC Plant Biol.* 14, doi: 10.1186/1471-2229-14-110.



Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwarz, M., Barron, D., Routaboul, J.-M., Debeaujon, I. Klein, M. (2007). The Arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H<sup>+</sup>-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell* 19, 2023–2038.

Martinez-Esteso, M.J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J.C., Pedreño, M.A. Bru-Martinez, R. (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. *J. Proteomics* 73, 331–341.

Martinez-Esteso, M.J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J.C., Pedreño, M.A. Bru-Martinez, R. (2011). DIGE analysis of proteome changes accompanying large resveratrol production by grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to methyl- $\beta$ -cyclodextrin and methyl jasmonate elicitors. *J. Proteomics* 74, 1421–1436.

Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K. Amrhein, N. (1993). ATP-dependent glutathione S-conjugate “export” pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364, 247–249.

McTavish, D. Sorkin, E.M. (1989). Verapamil. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension. *Drugs* 38, 19–76.

Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A.M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O’Keefe, S.F., Bennett, S. Dolan, M.C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* 68, 1992–2003.

Melin, P., Hosy, E., Vivaudou, M. Becq, F. (2007). CFTR inhibition by glibenclamide requires a positive charge in cytoplasmic loop three. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768, 2438–2446.

Nagy, R., Grob, H., Weder, B., Green, P., Klein, M., Frelet-Barrand, A., Schjoerring, J.K., Brearley, C. Martinoia, E. (2009). The Arabidopsis ATP-binding cassette protein AtMRP5/AtABCC5 is a high affinity inositol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage. *J. Biol. Chem.* 284, 33614–33622.

Nopo-Olazabal, C., Hubstenberger, J., Nopo-Olazabal, L. Medina-Bolivar, F. (2013). Antioxidant activity of selected stilbenoids and their bioproduction in hairy root cultures of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.). *J. Agric. Food Chem.* doi: 10.1021/jf400760k



- Parage, C., Tavares, R., Réty, S., Baltenweck-Guyot, R., Poutaraud, A., Renault, L., Heintz, D., Lugan, R., Marais, G.A.B., Aubourg, S., Hugueney, P. (2012). Structural, functional, and evolutionary analysis of the unusually large stilbene synthase gene family in grapevine. *Plant Physiol.* *160*, 1407–1419.
- Poutaraud, A., Latouche, G., Martins, S., Meyer, S., Merdinoglu, D. Cerovic, Z.G. (2007). Fast and local assessment of stilbene content in grapevine leaf by *in vivo* fluorometry. *J. Agric. Food Chem.* *55*, 4913–4920.
- Rea, P.A. (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* *58*, 347–375.
- Rivière, C., Pawlus, A.D. Mérillon, J.-M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. *Nat. Prod. Rep.* *29*, 1317–1333.
- Schneider, C.A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods* *9*(7): 671-675.
- Shitan, N. (2016). Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* doi: 10.1080/09168451.2016.1151344.
- Shoji, T. (2014). Chapter Six - ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants: a common theme among diverse detoxification mechanisms. in international review of cell and molecular biology, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 303–346.
- Thompson, E.P., Davies, J.M. Glover, B.J. (2010a). Identifying the transporters of different flavonoids in plants. *Plant Signal. Behav.* *5*, 860–863.
- Thompson, E.P., Wilkins, C., Demidchik, V., Davies, J.M. Glover, B.J. (2010b). An *Arabidopsis* flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. *J. Exp. Bot.* *61*, 439–451.
- Van Den Brûle, S., Müller, A., Fleming, A.J. Smart, C.C. (2002). The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal diterpene sclareol. *Plant J.* *30*, 649–662.





Versari, A., Parpinello, G.P., Tornielli, G.B., Ferrarini, R. Giulivo, C. (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 5531–5536.

Vuong, T.V., Franco, C. Zhang, W. (2014). Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. *Biotechnol. Rep.* 1–2, 15–21.

Wang, W., Tang, K., Yang, H.-R., Wen, P.-F., Zhang, P., Wang, H.-L. Huang, W.-D. (2010). Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* *48*, 142–152.

Widholm, J.M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol.* *47*, 189–194.

Zhao, J. Dixon, R.A. (2009). MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3 - o-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* *21*, 2323–2340.



Supplemental data S1: HCA groups of regulated PM proteins

Group	Gi	At name
<b>1</b>	731392539	elongation factor 1-alpha 4
	359487829	O-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL) isoform A1
<b>2</b>	359487829	O-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL) isoform A1
	296513105	serine hydroxymethyltransferase 4
	731370100	lipid phosphate phosphatase 3
	225443962	Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4)
	61613085	sugar transport protein 7
	731425893	Hypersensitive-induced response protein 1
	731423236	multi-copper oxidase-like protein SKU5
	731379237	Protein kinase protein with tetratricopeptide repeat domain
	526117828	putative calcium-binding protein CML13
	296085019	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 9
	296089351	uncharacterized protein
	225443962	Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4)
	359493985	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
	297797009	putative aquaporin PIP2-4
	731398783	patellin-6
	731383682	Ras-related protein RABG3f
	296087139	receptor-like kinase 1
	225438157	phosphate transporter 1;7
	82623373	40S ribosomal protein S7-1
	357472677	Ras-related small GTP-binding family protein
	297746202	tetraspanin3
	526117501	sugar transporter 1
	526117501	sugar transporter 1
	297735583	alpha-soluble NSF attachment protein 2
	225440708	NDR1/HIN1-Like protein 1
	526117501	sugar transporter 1
	731408584	ubiquitin-specific protease family C19-related protein
	296090261	Lysine histidine transporter 1
	359472575	transmembrane kinase 1
	297744977	RAB GTPase homolog 1C
	731406213	sucrose synthase 4
	297737518	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1
731390530	leucine-rich repeat protein kinase-like protein	
296090261	Lysine histidine transporter 1	
731430757	DHHC-type zinc finger family protein	
<b>3</b>	8071626	aquaporin PIP1-2
	731409677	STRUBBELIG-receptor family 3
	359472575	transmembrane kinase 1
	8071620	putative aquaporin PIP2-5

	297738348	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C subunit 1
	359481709	calcium-dependent protein kinase 32
	297740685	uncharacterized protein
	296513105	serine hydroxymethyltransferase 4
	297741153	multi-copper oxidase-like protein SKU5
	225463272	syntaxin-121
	731383135	Squalene synthase 1
	225431169	60S ribosomal protein L8-3
	225453350	nucleoside diphosphate kinase 1
	296088260	ammonium transporter 1;1
	731400067	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
	302142682	HSP90-like protein GRP94
	147774419	P-glycoprotein 11
	296090261	Lysine histidine transporter 1
	225451995	14-3-3-like protein GF14 nu
	731398317	syntaxin of plants 131
	719987456	thioredoxin H9
	297738889	leucine-rich repeat protein kinase family protein
	296087125	60S ribosomal protein L13-1
	8071628	plasma membrane intrinsic protein 3
	731439810	protein kinase
	225439223	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase
	731423236	multi-copper oxidase-like protein SKU5
	225445666	<i>trans</i> -cinnamate 4-monooxygenase
	359495700	PapD-like superfamily protein
	8071626	aquaporin PIP1-2
	694446946	putative aquaporin PIP2-5
	302142640	glycosyl hydrolase 9B7
	731379237	Protein kinase protein with tetratricopeptide repeat domain
	731436778	Quinone reductase family protein
	731429087	WPP domain-containing protein 2
	8071626	aquaporin PIP1-2
	296086429	Hypersensitive-induced response protein 1
	225461654	14-3-3-like protein GF14 mu
	225426743	UDP-4-keto-6-deoxy-d-glucose-3,5-epimerase-4-reductase 1
	297737518	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1
4	297737518	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 1
	225450802	respiratory burst oxidase-D
	66016961	sugar transport protein 13
	225468983	14-3-3-like protein GF14 omega
	731434720	plasma-membrane associated cation-binding protein 1
	703152199	abc transporter G family member 40
	225456422	putative S-acyltransferase
	731415206	alcohol dehydrogenase-like protein
	225430832	Quinone reductase family protein

	296089686	Respiratory burst oxidase-B
	66016961	sugar transport protein 13
	731402063	late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycoprotein
	297743354	abc transporter G family member 40
	359480598	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8
<b>5</b>	359480598	cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8
	225429772	H(+)-ATPase 5
	731390739	PTI1-like tyrosine-protein kinase 3
	297736208	60S ribosomal protein L6-3
	225460973	calmodulin-domain protein kinase 9
	302143167	flavodoxin-like quinone reductase 1
	227474842	inorganic phosphate transporter 1-4
	297743118	60S ribosomal protein L28-2
	38347366	L-type lectin-domain containing receptor kinase IX.1
	731425910	H(+)-ATPase 11
	225430832	Quinone reductase family protein
	734356602	auxin efflux transmembrane transporter MDR4
	297743362	abc transporter G family member 40
	731402585	abc transporter G family member 40
	296089686	Respiratory burst oxidase-B
	533775	H(+)-ATPase 11
	296083701	peptide transporter 3
	225462013	Heat shock protein 90-4
	66016961	sugar transport protein 13
	731390530	leucine-rich repeat protein kinase-like protein
<b>6</b>	731390530	leucine-rich repeat protein kinase-like protein
	225424908	voltage dependent anion channel 1
	225452186	prohibitin 3
	296082856	voltage dependent anion channel 1
	225455153	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family protein
	698483333	60S ribosomal protein L18-2
	297735387	voltage dependent anion channel 4
	225437447	60S ribosomal protein L19-2
	296082856	voltage dependent anion channel 1
	413946491	ubiquitin-conjugating enzyme E2 36
	728846167	tubulin alpha-3
	728813430	abc transporter C family member 4
	702484152	abc transporter G family member 40
	225424908	voltage dependent anion channel 1
	302144015	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family protein
	9802775	ubiquitin-conjugating enzyme E2 36
	296082856	voltage dependent anion channel 1
<b>7</b>	731408271	diacylglycerol kinase 3



## Conclusion générale et perspectives

---

Les objectifs de la thèse étaient (i) la mise au point et (ii) l'étude d'un système de culture de racines transformées de vigne pour la production de stilbènes. Ce type de système représente un outil pour l'étude du système racinaire de la vigne et éventuellement un moyen de production peu coûteux de stilbènes à haute valeur ajoutée. Par rapport aux systèmes actuels, utiliser des racines transformées de *Vitis vinifera* présente un certain nombre d'avantages et de spécificités intéressantes. Tout d'abord, le fait d'utiliser des cellules différenciées, en opposition aux cultures de cellules en suspension, pourrait permettre de produire des stilbènes plus complexes et jusqu'alors majoritairement inaccessibles par des systèmes de culture *in vitro*. La culture d'organes facilite aussi la séparation plante/milieu, ce qui simplifie la mise en œuvre de procédés tels que le renouvellement de milieu ou la récupération des molécules excrétées en cours de culture. De plus, les racines transformées permettent une culture sans ajout de phytohormones dans le milieu de culture et présentent une très bonne stabilité génétique et phytochimique. Par rapport aux cultures de racines transformées de muscadine (Nopo-Olazabal *et al.*, 2013) et d'arachide (Medina-Bolivar *et al.*, 2007) déjà établies pour la production de *t*-resvératrol et certains de ses dérivés, l'utilisation de *Vitis vinifera* L. permet la production d'autres dérivés stilbéniques incluant de nombreux dimères de resvératrol ainsi que des trimères et tétramères. Finalement, l'utilisation de la lignée de vigne séquencée PN40024 comme base pour la génération des racines transformées facilitera les travaux futurs en biologie moléculaire, protéomique et génomique sur cet outil.

En premier lieu, le travail réalisé a donc permis de montrer qu'il est possible de transformer la vigne *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir PN40024 *via Rhizobacterium rhizogenes* ATCC15834, ce qui constituait le premier verrou majeur de cette étude. Après isolement et stabilisation des lignées, nous avons amélioré les conditions de culture. Un temps de doublement de 7 jours en milieu ½ SH- avec 2 % saccharose a été obtenu, au lieu de 24 jours initialement en milieu Gamborg avec 3 % de saccharose. Dans ces conditions, la cinétique de croissance a montré une croissance en trois phases, sans phase de latence. La croissance exponentielle est maintenue pendant environ 11 jours, elle diminue jusqu'à atteindre un plateau après 31 jours. L'analyse du contenu en stilbènes de nos racines a montré une production constitutive avec une faible excrétion dans le milieu de culture. La concentration intra-racinaire en stilbènes semble liée à la croissance, avec une augmentation lente au cours





de la cinétique avant une augmentation rapide en phase de ralentissement puis une stabilisation en phase stationnaire. L'induction de la production avec du MeJA et des CDs a montré une réponse très marquée de ce métabolisme, avec des augmentations de la concentration de stilbènes mesurés (somme de picéide, resvératrol,  $\epsilon$ - et -viniférines) par rapport au contrôle. Ces dernières ont atteint un facteur de 3,9 et 19,8 respectivement pour celles induites au MeJA et de 5,7 et 1336,7 respectivement pour celles cultivées avec des CDs et induites au MeJA. Ceci représente des concentrations maximales mesurées de 1034  $\mu\text{g/g}$  MF dans les racines et 165 mg/l dans le milieu de culture, correspondant à une production spécifique très importante, atteignant un total de stilbènes produits (intra et extracellulaires) de 18,1 mg/g MF racines. Les taux d'excrétion des stilbènes dans le milieu de culture par rapport aux stilbènes totaux ont été améliorés de 5 % sans induction à 23 % après induction au MeJA et au-delà de 88 % avec des cyclodextrines. Bien qu'une amélioration des conditions de culture et de production soit encore possible, ces résultats montrent que l'utilisation des racines transformées de vigne peut permettre une production spécifique de stilbènes comparable aux meilleurs systèmes *in vitro* utilisés à l'heure actuelle. De plus, l' $\epsilon$ - et la -viniférine ont été montrées comme les stilbènes majoritairement produits par les racines transformées de vigne, selon les conditions testées (allant jusqu'à 65 % des stilbènes dosés totaux). Ces deux molécules restent difficiles à produire par les procédés alternatifs. Des tests préliminaires utilisant des fioles d'Erlenmeyer de 20 ml allant à 3 L puis en bioréacteur de 2 L laissent penser que la montée en échelle des volumes de culture est réalisable. Il serait toutefois pertinent d'améliorer encore les conditions de culture et de prolonger les durées de culture avec des procédés de fedbatch pour obtenir une biomasse beaucoup plus importante par volume de milieu avant élicitation. Les conditions d'induction pourront ensuite être optimisées pour permettre, par exemple, des élicitations multiples, séparées par des phases de "repos" pour les racines. En parallèle, des approches de récupération des stilbènes peuvent être mises en œuvre pendant la culture. L'utilisation de résines de type XAD ou Amberlite a déjà été testée (Donnez *et al*, 2010) sur des cellules de vigne en suspension et a donné des résultats intéressants. Il existe aussi d'autres solutions à tester telles que l'utilisation de solvants d'extractions insolubles avec le milieu de culture (tels que le benzoate de benzyle, voir Annexe : publication 5) ou d'autres supports à forte affinité avec les stilbènes tels que la cellulose.

L'étude du profil phytochimique des racines et des stilbènes excrétés a montré une diversité importante de stilbènes produits en comparaison avec les systèmes de culture de cellules différenciées. L'analyse du profil des racines traitées au MeJA et aux CDs a montré



la présence de 17 différents stilbènes dans les racines et 19 dans leur milieu de culture. Malgré la diversité de stilbènes détectés, le *t*-resvératrol et l' *p*-viniférine constituent la majorité des stilbènes produits dans les racines (représentant environ 45 % et 25 % des stilbènes dosés totaux respectivement), ainsi que dans le milieu de culture (55 % et 40 % respectivement) dans les conditions testées pour la caractérisation du profil phytochimique. Au vu de l'intérêt tout particulier que représentent les dérivés complexes de resvératrol, notamment les trimères et tétramères (Xue *et al.*, 2014), il serait pertinent de tester l'utilisation d'autres éliciteurs et de différents temps de prélèvements pour améliorer plus spécifiquement la production de certains composés d'intérêt. Il est aussi possible qu'une lignée parmi les 8 autres conservées possède des spécificités au niveau du profil phytochimique ou du comportement vis-à-vis des différents éliciteurs. De ce point de vue, l'optimisation des lignées de production pourrait aller jusqu'à générer de nouvelles lignées à partir d'autres souches de *Rhizobacterium rhizogenes* et éventuellement d'autres cépages pour sélectionner la meilleure lignée issue de la combinaison souche-cépage-élicitation optimale. En effet, il a été montré que les différents cépages de vigne ne réagissent pas de la même façon à un traitement éliciteur (Guerrero *et al.*, 2010). Une production en quantité suffisante de ces composés permettrait leur séparation et purification afin de les utiliser comme standards, pour une quantification et un suivi plus rapide lors des prochains tests, ainsi que d'évaluer leurs activités et donc leur intérêt industriel.

Au delà de l'amélioration de la production des composés d'intérêt ciblés, la question de leur déplacement dans la plante, entre les différents organes et au niveau cellulaire est aussi particulièrement importante. La compréhension des mécanismes impliqués dans le transport des stilbènes permettrait de nouvelles approches pour l'utilisation des défenses naturelles de la plante en agronomie et fournirait aussi des nouveaux outils pour améliorer les systèmes de bioproduction. Des observations ont montré que la localisation des stilbènes était espèce (Chung *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2010), organe et tissu – spécifique (Houillé *et al.*, 2015), ce qui implique des moyens de transport ou de synthèse différentielle des stilbènes. La recherche de protéines de la membrane plasmique induites ou réprimées par le MeJA ou le *t*-resvératrol utilisant des méthodes de protéomique globale telles que l'iTRAQ permet une première sélection des candidats pour le transport de *t*-resvératrol. En effet, il est très probable que la production du transporteur de *t*-resvératrol soit couplée avec sa bioproduction et son apparition en masse dans le milieu de culture. Ce transport étant potentiellement induit par le stress provoquant l'activation de la voie de biosynthèse (ici mimé par l'utilisation de MeJA), ou par la molécule transportée (ici, le *t*-resvératrol), nous avons comparé ces deux conditions



à un témoin non traité. L'analyse de ces données sur cellules en suspension de *Vitis labrusca* a permis de faire ressortir 7 protéines transmembranaires de type ABCG transporteurs dont les séquences sont proches des ABCG34, 39 et 40 caractérisés chez *Arabidopsis thaliana*. Cette hypothèse est soutenue par les résultats des tests utilisant des inhibiteurs spécifiques de différents types de transporteurs, montrant une diminution de l'excrétion du *t*-resvératrol en présence de glibenclamide, un inhibiteur spécifique des ABC transporteurs et aucun effet du vérapamil, inhibiteur des canaux calciques. Le manque d'annotation des protéines de vigne ne permettant pas d'identifier avec exactitude les candidats, nous allons restreindre leur nombre à l'aide d'analyses d'expression des gènes correspondants. Le taux d'homologie entre les séquences des transporteurs ABCG de vigne, allant de 46 à 97%, rend le dessin d'amorces spécifiques difficile. L'amplification spécifique des différents groupes d'ABCG concernés permettra de montrer l'éventuelle implication d'un groupe d'ABCG en particulier dans la réponse au traitement par le MeJA ou le *t*-resvératrol et ainsi limiter le nombre de candidats. La suite de ce travail consisterait à identifier spécifiquement un transporteur et à montrer sa capacité à transporter le resvératrol *in vitro* et *in vivo*. Ceci pourrait se faire par exemple en l'exprimant dans une levure et en montrant une résistance accrue au *t*-resvératrol de cette souche par rapport à la souche sauvage. Une fois le transporteur de *t*-resvératrol mis en évidence dans les cellules en suspension, il serait intéressant de décrire les changements de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du *t*-resvératrol dans les racines de vigne (*PAL*, *STS*) et son transporteur, suite à une induction au MeJA.

Une démarche similaire à celle utilisée pour le transporteur de resvératrol pourrait être envisagée pour élucider d'autres mécanismes de régulation et de biosynthèse de la voie métabolique des stilbènes. La première étape pour cette étude consisterait à cribler différentes conditions d'induction (durée et type du traitement) pour favoriser la synthèse d'un dérivé de resvératrol en particulier (trimères, tétramères ou les dérivés peu communs comme la maakine). Des approches couplées de protéomique globale (iTRAQ sur protéines totales par exemple) et de métabolomique globale dans ces conditions permettraient ensuite de mettre en évidence des acteurs spécifiques à la production de la molécule choisie. Des travaux de ce type, visant à caractériser une peroxydase (gil157336988), sont en cours à l'URVVC. Cette protéine a été montrée comme sur-représentée dans des cellules en suspension de *Vitis vinifera* L. cv Gamay suite à un traitement avec du MeJA et/ou des CDs (Martinez-Esteso *et al.*, 2009). Il est donc probable qu'elle soit impliquée dans la réaction de défense et notamment dans la formation de viniférines. La confirmation de l'expression du gène correspondant par qPCR dans ces conditions permettra de valider ou non le candidat. La



caractérisation de cette peroxydase par expression hétérologue en levure permettra de confirmer ou d'infirmer son rôle potentiel dans la synthèse des stilbènes avant une caractérisation *in vivo*. Les cultures de racines transformées de la lignée séquencée PN40024 peuvent constituer un outil particulièrement adapté pour réaliser cette dernière étape. En effet, ces cultures permettront la confirmation de l'expression du gène dans un organe lors de la production de viniférines suite à un traitement d'induction. De plus, le protocole de génération des racines transformées permet d'envisager la génération de nouvelles racines, génétiquement modifiées, pour surexprimer ou réprimer (par ARN interférant) le gène d'intérêt et ainsi le caractériser *in vivo*. Il suffit pour cela d'insérer le transgène dans la région T du plasmide Ri de *R. rhizogenes* avant infection de la plante.

Des premiers tests avaient été réalisés dans le but d'utiliser des substrats marqués au  $^{13}\text{C}$  pour réaliser un suivi de leur incorporation dans la voie métabolique. L'utilisation de tyrosine et de phénylalanine marquées permettrait d'estimer la capacité des racines de vigne à synthétiser des stilbènes à partir de chacun de ces précurseurs, leur flux et d'estimer la proportion provenant de chaque voie dans le métabolisme racinaire. Langcake et Pryce (1977b) ont réalisé des premiers travaux sur le suivi de marquage au  $^{14}\text{C}$ , montrant un pourcentage d'incorporation de la tyrosine dans les stilbènes 10 et 400 fois moins important que la phénylalanine dans les baies et les feuilles respectivement, en utilisant des quantités de radioactivité comparables. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats dans les racines. De plus, il a été montré que certaines plantes possèdent la phénylalanine hydroxylase ainsi qu'une phénylpyruvate aminotransférase, qui permettent la synthèse de phénylalanine à partir de tyrosine (Pribat *et al.*, 2010 ; Yoo *et al.*, 2013), ce qui peut compliquer les études portant sur ces deux substrats. L'utilisation d'un métabolite situé plus en aval dans la voie métabolique, tel que le coumarate marqué au  $^{13}\text{C}$  permettrait quant à elle moins de pertes de signal dans le métabolisme primaire et secondaire et serait mieux adaptée au suivi de la cinétique d'apparition des différents dérivés de *t*-resvératrol. Ces réactifs étant extrêmement coûteux, nous avons choisi de les synthétiser chimiquement. Les premiers résultats de synthèse chimique de coumarate à partir de 4-hydroxybenzaldehyde et de malonate (1 h à 55 °C puis 2 h à 85 °C dans de la pyridine + pipéridine) ont donné des rendements de synthèse de 5 à 6 %, ce qui reste largement insuffisant au vu du prix des réactifs. Finalement, des tests (résultats non montrés) visant à mettre en évidence l'effet de ces composés sur la croissance et la production de stilbènes ont été réalisés en ajoutant 4 mM de phénylalanine, tyrosine, la combinaison des deux ou 4 mM de coumarate à une culture de racines. La tyrosine, très peu soluble a précipité après quelques jours de culture et a donné





lieu à une perte de viabilité des racines sans affecter leur contenu en stilbènes. La phenylalanine a induit une augmentation de la production en stilbènes et le coumarate a causé un faible changement de couleur des racines, sans affecter leur contenu en stilbènes. Ces résultats préliminaires suggèrent la nécessité d'un important travail de mise au point, qu'il serait intéressant de réaliser par la suite.

De façon plus générale, les cultures de racines transformées de vigne, leur protocole de génération et de culture constituent un nouvel outil, offrant des nouvelles possibilités de recherche sur les autres thématiques développées au laboratoire BIOPI et à l'URVVC. L'utilisation de racines transformées constitue l'intermédiaire entre les modèles d'études sur cellules dédifférenciées et les vitroplants, offrant un système organisé en tissus sans aller jusqu'à l'organisme complet. Cet outil pourrait notamment faciliter l'étude des exsudats racinaires, ou des interactions plantes-bactéries pathogènes ou plantes-bactéries PGPR du fait de la difficulté d'accès aux racines naturelles et des conditions plus faciles à maîtriser en culture *in vitro*. Finalement, le protocole de transformation mis au point peut être mis en œuvre pour générer de nouvelles lignées de racines transformées à partir de souches de *R. rhizogenes* portant un transgène d'intérêt pour étudier son effet *in planta*, ce qui permet d'envisager des études extrêmement variées telles que la surexpression de certains gènes (biosynthèse, transporteur ou autres) ou le silencing d'autres (réprimant les acteurs impliqués dans la biosynthèse des stilbènes) ou pour des applications toutes autres, portant sur l'étude de l'importance de gènes d'intérêt dans divers mécanismes biologiques.



## Références

---

Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S. et Dixon, R.A. (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16, 3098–3109.

Adrian, M. et Jeandet, P. (2012). Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83, 1345–1350.

Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R. et Joubert, J.M. (1996). Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>). *J. Agric. Food Chem.* 44, 1979–1981.

Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A. et Bessis, R. (1997). Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J. Chem. Ecol.* 23, 1689–1702.

Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Tesson, L. et Bessis, R. (2000). Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6103–6105.

Al Balkhi, M.H., Schiltz, S., Lesur, D., Lanoue, A., Wadouachi, A. et Boitel-Conti, M. (2012) Norlittorine and norhyoscyamine identified as products of littorine and hyoscyamine metabolism by (13) C-labeling in *Datura innoxia* hairy roots. *Phytochemistry*, 74, 105-114.

Alejandro, S., Lee, Y., Tohge, T., Sudre, D., Osorio, S., Park, J., Bovet, L., Lee, Y., Geldner, N., Fernie, A.R. et Martinoia, E. (2012). AtABCG29 Is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr. Biol.* 22, 1207–1212.

Aleynova, O.A., Dubrovina, A.S., Manyakhin, A.Y., Karetin, Y.A. et Kiselev, K.V. (2014). Regulation of resveratrol production in *Vitis amurensis* cell cultures by calcium-dependent protein kinases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175, 1460-1476.

Aleynova-Shumakova, O.A., Dubrovina, A.S., Manyakhin, A.Y., Karetin, Y.A. et Kiselev, K.V. (2014). VaCPK20 gene overexpression significantly increased resveratrol content and



expression of stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. Appl. Microbiol. Biotechnol. 10.1007/s00253-014-5625-7.

Ali, K., Maltese, F., Choi, Y.H. et Verpoorte, R. (2010). Metabolic constituents of grapevine and grape-derived products. Phytochem. Rev. 9, 357–378.

Ali, A. et Strommer, J. (2003). A simple extraction and chromatographic system for the simultaneous analysis of anthocyanins and stilbenes of *Vitis* Species. J. Agric. Food Chem. 51, 7246–7251.

Alonso-Villaverde, V., Voinesco, F., Viret, O., Spring, J.-L. et Gindro, K. (2011). The effectiveness of stilbenes in resistant *Vitaceae*: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. Plant Physiol. Biochem. 49, 265–274.

Aluyen, J.K., Ton, Q.N., Tran, T., Yang, A.E., Gottlieb, H.B. et Bellanger, R.A. (2012). Resveratrol: potential as anticancer agent. J. Diet. Suppl. 9, 45–56.

Andersen, T.G et Halkier BA. (2014). Upon bolting the GTR1 and GTR2 transporters mediate transport of glucosinolates to the inflorescence rather than roots. Plant Signal Behav. 9, e27740.

Andersen, T.G., Nour-Eldin, H.H., Fuller V.L., Olsen, C.E., Burow, M. et Halkier, B.A. (2013). Integration of biosynthesis and long-distance transport establish organ-specific glucosinolate profiles in vegetative *Arabidopsis*. Plant Cell. 25, 3133–3145.

Andrus, M. et Meredith, E. (2001). Synthesis of resveratrol. Brigham Young University, Brevet WO2001060774A1

Baetz, U., et Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. Trends Plant Sci. 19, 90–98.

Ballaré, C.L. (2011). Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. Trends Plant Sci. 16, 249–257.

Banasiak, J., Biala, W., Staszaków, A., Swarczewicz, B., Kepczynska, E., Figlerowicz, M. et Jasinski, M. (2013). A *Medicago truncatula* ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. J. Exp. Bot. 64, 1005–1015.



- Banerjee, S., Singh, S. et Rahman, L.U. (2012). Biotransformation studies using hairy root cultures — A review. *Biotechnol. Adv.* 30, 461–468.
- Barlass, M., Miller, R.M. et Douglas, T.J. (1987). Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. II. Resveratrol Production. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 65–68.
- Becker, J.V.W., Armstrong, G.O., van der Merwe, M.J., Lambrechts, M.G., Vivier, M.A. et Pretorius, I.S. (2003). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res.* 4, 79–85.
- Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., de Vos, C.H.R. et Bovy, A. (2006). Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5670–5672.
- Bellow, S., Latouche, G., Brown, S.C., Poutaraud, A. et Cerovic, Z.G. (2012). In vivo localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *J. Exp. Bot.* 63, 3697–3707.
- Beová, B., Adam, M., Onderková, K., Královský, J. et Krajíek, M. (2008). Analysis of selected stilbenes in *Polygonum cuspidatum* by HPLC coupled with CoulArray detection. *J. Sep. Sci.* 31, 2404–2409.
- Bessire, M., Chassot, C., Jacquat, A.-C., Humphry, M., Borel, S., Petétot, J.M.-C., Métraux, J.-P. et Nawrath, C. (2007). A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO J.* 26, 2158–2168.
- Bessire, M., Borel, S., Fabre, G., Carraça, L., Efremova, N., Yephremov, A., Cao, Y., Jetter, R., Jacquat, A.-C., Métraux, J.-P. et Nawrath, C. (2011). A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23, 1958–1970.
- Bhullar, K.S. et Hubbard, B.P. (2015). Lifespan and healthspan extension by resveratrol. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1209–1218.
- Bhan, N., Xu, P., Khalidi, O. et Koffas, M.A.G. (2013). Redirecting carbon flux into malonyl-CoA to improve resveratrol titers: proof of concept for genetic interventions predicted by OptForce computational framework. *Chem. Eng. Sci.* 103, 109–114.





- Bienert, M.D., Siegmund, S.E., Drozak, A., Trombik, T., Bultreys, A., Baldwin, I.T., Boutry, M. (2012) A pleiotropic drug resistance transporter in *Nicotiana tabacum* is involved in defense against the herbivore *Manduca sexta*. *Plant J.* 72, 745–757
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A. et Samuels, L. (2007). Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J.* 52, 485–498.
- Blaich, R. et Bachmann, O. (1980). The resveratrol synthesis in *Vitaceae* induction and cytological observations. *Vitis* 19, 230–240.
- Bligny, R., Gout, E., Kaiser, W., Heber, U., Walker, D. et Douce, R. (1997). pH regulation in acid-stressed leaves of pea plants grown in the presence of nitrate or ammonium salts: studies involving <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy and chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1320, 142–152.
- Boominathan, R. et Doran, P.M. (2003a). Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *J. Biotechnol.* 101, 131–146.
- Boominathan, R. et Doran, P.M. (2003b). Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 158–167.
- Borie, B., Jeandet, P., Parize, A., Bessis, R. et Adrian, M. (2004). Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. *Am. J. Enol. Vitic.* 55, 60–64.
- Bru, R., Sellés, S., Casado-Vela, J., Belchí-Navarro, S. et Pedreño, M.A. (2006). Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J. Agric. Food Chem.* 54, 65–71.
- Bru Martinez, R.. et Pedreno Garcia, M. del los A. (2006). Method for the production of resveratrol in cell cultures. Brevet, US 20060205049 A1.



Buda, G.J., Barnes, W.J., Fich, E.A., Park, S., Yeats, T.H., Zhao, L., Domozych, D.S. et Rose J.K. (2013). An ATP binding cassette transporter is required for cuticular wax deposition and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*. 25, 4000–4013.

Bulgakov, V.P. (2008). Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Adv.* 26, 318–324.

Bulgakov, V.P., Tchernoded, G.K., Mischenko, N.P., Khodakovskaya, M.V., Glazunov, V.P., Radchenko, S.V., Zvereva, E.V., Fedoreyev, S.A. et Zhuravlev, Y.N. (2002). Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *J. Biotechnol.* 97, 213–221.

Bultreys, A., Trombik, T., Drozak, A. et Boutry, M. (2009). *Nicotiana plumbaginifolia* plants silenced for the ATP-binding cassette transporter gene NpPDR1 show increased susceptibility to a group of fungal and oomycete pathogens. *Mol. Plant Pathol.* 10, 651– 663.

Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spanò, L., Capone, I. et Costantino, P. (1987). *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype. *Mol. Gen. Genet.* MGG 209, 475–480.

Castellano, G., Lara, A. et Torrens, F. (2014). Classification of stilbenoid compounds by entropy of artificial intelligence. *Phytochemistry* 97, 62–69.

Celimene, C.C., Smith, D.R., Young, R.A. et Stanosz, G.R. (2001). *In vitro* inhibition of *Sphaeropsis sapinea* by natural stilbenes. *Phytochemistry* 56, 161–165.

Chalal, M., Klinguer, A., Echairi, A., Meunier, P., Vervandier-Fasseur, D. et Adrian, M. (2014). Antimicrobial activity of resveratrol analogues. *Molecules* 19, 7679–7688.

Chalker-Scott, L. (1999). environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem. Photobiol.* 70, 1–9.

Campbell, E.J., Schenk, P.M., Kazan, K., Penninckx, I.A.M.A., Anderson, J.P., Maclean, D.J., Cammue, B.P.A., Ebert, P.R. et Manners, J.M. (2003). Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 1272–1284.



- Chandra, S. (2011). Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnol. Lett.* 34, 407–415.
- Chandra, S. et Chandra, R. (2011). Engineering secondary metabolite production in hairy roots. *Phytochem. Rev.* 10, 371–395.
- Chaohong F., Ni P., Xiping W., Yuejin W., Li F., Weirong X. et Jianxia Z. (2007). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) with a novel stilbene synthase gene from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92, 197–206.
- Charlton, J.L. et Saltiel, J. (1977). An analysis of *trans*-stilbene fluorescence quantum yields and lifetimes. *J. Phys. Chem.* 81, 1940–1944.
- Chastang, T., (2014). Etude de la synthèse du resvératrol et de ses dérivés (viniférines) par des suspensions de cellules de vigne et optimisation de la production biotechnologique. Thèse. Ecole Centrale Paris.
- Chattopadhyay, S., Farkya, S., Srivastava, A.K. et Bisaria, V.S. (2002). Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7, 138–149.
- Chen, G., Komatsuda, T., Ma, J.F., Li, C., Yamaji, N. et Nevo, E. (2011). A functional cutin matrix is required for plant protection against water loss. *Plant Signal Behav.* 6, 1297–1299.
- Chen, G., Komatsuda, T., Ma, J.F., Nawrath, C., Pourkheirandish, M., Tagiri, A., Hu, Y.G., Sameri, M., Li, X., Zhao, X., Liu, Y., Li, C., Ma, X., Wang, A., Nair, S., Wang, N., Miyao, A., Sakuma, S., Yamaji, N., Zheng, X. et Nevo, E. (2011). An ATP-binding cassette subfamily G full transporter is essential for the retention of leaf water in both wild barley and rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108, 12354–12359.
- Chen, H., Tuck, T., Ji, X., Zhou, X., Kelly, G., Cuerrier, A. et Zhang, J. (2013). Quality assessment of japanese knotweed (*Fallopia japonica*) grown on Prince Edward island as a source of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6383–6392.
- Cheong, J.-J. et Choi, Y.D. (2003). Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends Genet.* 19, 409–413.



Chilton, M.-D., Tepfer, D.A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. et Tempé, J. (1982). *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295, 432–434.

Choi, D.-W., Jung, J., Ha, Y.I., Park, H.-W., In, D.S., Chung, H.-J. et Liu, J.R. (2005). Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites. *Plant Cell Rep.* 23, 557–566.

Choi, H., Jin, J.Y., Choi, S., Hwang, J.U., Kim, Y.Y., Suh, M.C. et Lee, Y. (2011). An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. 65, 181-93.

Choi, H., Ohyama, K., Kim, Y.-Y., Jin, J.-Y., Lee, S.B., Yamaoka, Y., Muranaka, T., Suh, M.C., Fujioka, S. et Lee, K.Y. (2014). The role of *Arabidopsis* ABCG9 and ABCG31 ATP binding cassette transporters in pollen fitness and the deposition of sterol glycosides on the pollen coat. *Plant Cell.* 26, 310–324.

Chong, J., Poutaraud, A. et Hugueney, P. (2009). Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 177, 143–155.

Christey, M.C. et Braun, R.H. (2005). Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 286, 47–60.

Chung, I.-M., Park, M.R., Chun, J.C. et Yun, S.J. (2003). Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Sci.* 164, 103–109.

Cichewicz, R.H. et Kouzi, S.A. (2002). Resveratrol oligomers: structure, chemistry, and biological activity. In *Studies in Natural Products Chemistry*, Atta-ur-Rahman, ed. (Elsevier), 507–579.

Clouser, C.L., Chauhan, J., Bess, M.A., Oploo, J.L. van, Zhou, D., Dimick-Gray, S., Mansky, L.M. et Patterson, S.E. (2012). Anti-HIV-1 activity of resveratrol derivatives and synergistic inhibition of HIV-1 by the combination of resveratrol and decitabine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6642–6646.





- Commun, K., Mauro, M.-C., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M. et Jeandet, P. (2003). Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 317–323.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Langenbach, C.J.G. et Jaskiewicz, M.R. (2015). Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 97–119.
- Courteaux, B. (2007). Recherche d'éliciteurs pour l'induction de Resvératrol dans les suspensions cellulaires de porte greffe 41B et callogénèse sur *Vitis*. Rapport de stage effectué dans le cadre de la Licence Professionnelle Biotechnologies Appliquées à la Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R. et Boulay, M. (2001). *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *J. Exp. Bot.* 52, 901–910.
- Creelman, R.A. et Mullet, J.E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355–381.
- Crouzet J., Roland, J., Peeters, E., Trombik, T., Ducos, E., Nader, J. et Boutry, M. (2013). NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport. *Plant Mol. Biol.* 82, 181–192.
- Curtis, W.R. et Flickinger, M.C. (2010). Hairy roots, bioreactor growth. In encyclopedia of industrial biotechnology, (John Wiley & Sons, Inc.). doi: 10.1002/9780470054581.eib353
- Dai, G. (1995a). Histochemical responses of leaves of *in vitro* plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopath.* 85, 85-149.
- Dai, G.H., Andary, C., Mondolot-Cosson, L. et Boubals, D. (1995b). Histochemical studies on the interaction between three species of grapevine, *Vitis vinifera*, *V. rupestris* and *V. rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46, 177–188.
- de la Lastra, C.A. et Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1156–1160.



- Debeaujon, I., Peeters, A.J.M., Léon-Kloosterziel, K.M. et Koornneef, M. (2001). The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell*. 13, 853–871.
- Delaunoy, B., Cordelier, S., Conreux, A., Clément, C. et Jeandet, P. (2009). Molecular engineering of resveratrol in plants. *Plant Biotechnol. J.* 7, 2–12.
- De Paolis, A., Mauro, M.L., Pomponi, M., Cardarelli, M., Spanò, L. et Costantino, P. (1985). Localization of agropine-synthesizing functions in the TR region of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plasmid* 13, 1–7.
- Dercks, W. et Creasy, L.L. (1989). The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34, 189–202.
- Dixon, R. et Paiva, N. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085–1097.
- Donnez, D. (2006). Etude de l'induction de la biosynthèse des stilbènes dans les suspensions cellulaires de *Vitis* 41B par l'acide salicylique et le méthyljasmonate. Rapport de stage effectué dans le cadre du Master Recherche Production Végétale et Environnement, Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Donnez, D. (2010). Etude de la bioproduction des stilbènes dans les suspensions cellulaires de *Vitis* 41B : élévation et mécanismes de l'induction de la biosynthèse. Thèse Université de Reims Champagne-Ardenne.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clément, C. et Courot, E. (2009). Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends Biotechnol.* 27, 706–713.
- Donnez, D., Kim, K.-H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clément, C. et Courot, E. (2011). Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. *Process Biochem.* 46, 1056–1062.
- Dou, X.Y., Yang, K.Z., Zhang, Y., Wang, W., Liu, X.L., Chen, L.Q., Zhang, X.Q. et Ye, D. (2011). WBC27, an adenosine triphosphate-binding cassette protein, controls pollen wall formation and patterning in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol.* 53, 74–88.



Dubrovina, A.S., Kiselev, K.V., Veselova, M.V., Isaeva, G.A., Fedoreyev, S.A. et Zhuravlev, Y.N. (2009). Enhanced resveratrol accumulation in *rolB* transgenic cultures of *Vitis amurensis* correlates with unusual changes in *CDPK* gene expression. *J. Plant Physiol.* *166*, 1194–1206.

Dubrovina, A.S., Manyakhin, A.Y., Zhuravlev, Y.N. et Kiselev, K.V. (2010). Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in *rolC* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *88*, 727–736.

Ehltling, J., Hamberger, B., Million-Rousseau, R. et Werck-Reichhart, D. (2006). Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochem. Rev.* *5*, 239–270.

Fabre, G., Garroum, I., Mazurek, S., Daraspe, J., Mucciolo, A., Sankar, M., Humbel, B.M. et Nawrath, C. (2016). The ABCG transporter PEC1/ABCG32 is required for the formation of the developing leaf cuticle in *Arabidopsis*. *New Phytol.* *209*, 192–201.

Fan, E., Zhang, K., Zhu, M. et Wang, Q. (2010). Obtaining resveratrol: from chemical synthesis to biotechnological production. *mini-rev. Org. Chem.* *7*, 272–281.

Felle, H.H. et Hanstein, S. (2002). The apoplastic pH of the substomatal cavity of *Vicia faba* leaves and its regulation responding to different stress factors. *J. Exp. Bot.* *53*, 73–82.

Ferré-Filmon, K., Delaude, L., Demonceau, A., Noels, A.F. (2004). Catalytic methods for the synthesis of stilbenes with an emphasis on their phytoalexins. *Coord. Chem. Rev.* *248*(21-24), 2323-2336.

Fettig, S. et Hess, D. (1999). Expression of a chimeric stilbene synthase gene in transgenic wheat lines. *Transgenic Res.* *8*, 179–189.

Fischer, R., Budde, I. et Hain, R. (1997). Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *Plant J.* *11*, 489–498.

Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M.D., Arapitsas, P. et Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 19651–19669.

Flor, H.H. (1942). Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology.* *32*, 653-669.



- Flores, H.E., Hoy, M.W. et Pickard, J.J. (1987). Secondary metabolites from root cultures. *Trends Biotechnol.* 5, 64–69.
- Fornara, V., Onelli, E., Sparvoli, F., Rossoni, M., Aina, R., Marino, G. et Citterio, S. (2008). Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma* 233, 83–93.
- Fourcroy, P., Sisó-Terraza, P., Sudre, D., Savirón, M., Reyt, G., Gaymard, F., Abadía, A., Abadia, J., Alvarez-Fernández, A. et Briat, J.F. (2014). Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by *Arabidopsis* roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* 201, 155–167.
- Francisco, R.M., Regalado, A., Ageorges, A., Burla, B.J., Bassin, B., Eisenach, C., Zarrouk, O., Vialet, S., Marlin, T., Chaves, M.M., Martinoia E. et Nagy, R. (2013). ABCC1, an ATP binding cassette protein from grape berry, transports anthocyanidin 3-O-glucosides. *Plant Cell.* 25, 1840–1854.
- Franks, T.K., Powell, K.S., Choimes, S., Marsh, E., Iocco, P., Sinclair, B.J., Ford, C.M. et van Heeswijk, R. (2006). Consequences of transferring three *Sorghum* genes for secondary metabolite (cyanogenic glucoside) biosynthesis to grapevine hairy roots. *Transgenic Res.* 15, 181–195.
- Frank, S., Keck, M., Sagasser, M., Niehaus, K., Weisshaar, B. et Stracke, R. (2011). Two differentially expressed MATE factor genes from apple complement the *Arabidopsis* transparent *testa12* mutant. *Plant Biol. (Stuttg).* 13, 42–50.
- Futuyma, D.J. et Agrawal, A.A. (2009). Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 18054–18061.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D. et Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 19, 711–724.
- Gelvin, S.B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” Tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 16–37.
- Gelvin, S.B. (2012). Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA’s journey to the host genome. *Front. Plant Sci*, doi: 10.3389/fpls.2012.00052.





- Georgiev, M.I., Pavlov, A.I. et Bley, T. (2007). Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *74*, 1175–1185.
- Georgiev, M.I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J. et Xu, J. (2012). Genetically transformed roots: from plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol.* *30*, 528–537.
- Giacomini, E., Rupiani, S., Guidotti, L., Recanatini, M. et Roberti, M. (2016). The use of stilbene scaffold in medicinal chemistry and multi-target drug design. *Curr. Med. Chem.* *23*, doi: 10.2174/0929867323666160517121629.
- Giorcelli, A., Sparvoli, F., Mattivi, F., Tava, A., Balestrazzi, A., Vrhovsek, U., Calligari, P., Bollini, R. et Confalonieri, M. (2004). Expression of the stilbene synthase (*StSy*) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides. *Transgenic Res.* *13*, 203–214.
- Giovinazzo, G., D'Amico, L., Paradiso, A., Bollini, R., Sparvoli, F. et DeGara, L. (2005). Antioxidant metabolite profiles in tomato fruit constitutively expressing the grapevine stilbene synthase gene. *Plant Biotechnol. J.* *3*, 57–69.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* *43*, 205–227.
- Goel, M.K., Mehrotra, S. et Kukreja, A.K. (2011). Elicitor-induced cellular and molecular events are responsible for productivity enhancement in hairy root cultures: an insight study. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *165*, 1342–1355.
- Golstein, P.E., Boom, A., Geffel, J. van, Jacobs, P., Masereel, B. et Beauwens, R. (1999). P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflug. Arch.* *437*, 652–660.
- Gomez, C., Terrier, N., Torregrosa, L., Vialet, S., Fournier-Level, A., Verriès, C., Souquet, J-M., Mazauric, J-P., Klein, M., Cheynier, V. et Ageorges, A. (2009). Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H<sup>+</sup> Transport and self-tolerance of plant secondary metabolites 9 - dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant Physiol.* *150*, 402–415.
- Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N. et Ageorges, A. (2011). *In vivo* grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *Plant J.* *67*, 960–970.



- Gomord, V. et Faye, L. (2004). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 171–181.
- González-Sarriás, A., Gromek, S., Niesen, D., Seeram, N.P. et Henry, G.E. (2011). Resveratrol oligomers isolated from *Carex* species inhibit growth of human colon tumorigenic cells mediated by cell cycle arrest. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8632–8638.
- Goodman, C.D., Casati, P. et Walbot, V.A. (2004). Multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell.* 16, 1812–1826.
- Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P. et von Baer, D. (2014). Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chem.* 155, 256–263.
- Guerrero, R.F., Puertas, B., Fernández, M.I., Palma, M. et Cantos-Villar, E. (2010). Induction of stilbenes in grapes by UV-C: comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 231–238.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M. et Gantet, P. (2006a). Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 341–346.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M. et Gantet, P. (2006b). Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era. *Trends Biotechnol.* 24, 403–409.
- Ha Thi, L. (2005). *Panax vietnamensis*, an endangered plant species with high phytochemical interest; evaluation of its biotechnological potential for industrial valorization. Thèse, Université de Picardie Jule Vernes
- Hain, R., Bieseler, B., Kindl, H., Schröder, G. et Stöcker, R. (1990). Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol. Biol.* 15, 325–335.
- Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stöcker, R.H. et Stenzel K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153–156.



- Hall, D. et De Luca, V. (2007). Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*). *Plant J.* *49*, 579–591.
- Hamm, G., Carré, V., Poutaraud, A., Maunit, B., Frache, G., Merdinoglu, D. et Muller, J.-F. (2010). Determination and imaging of metabolites from *Vitis vinifera* leaves by laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *24*, 335–342.
- Hanhineva, K., Kokko, H., Siljanen, H., Rogachev, I., Aharoni, A. et Karenlampi, S.O. (2009). Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria xananassa*). *J. Exp. Bot.* *60*, 2093–2106.
- Hart, J.H. (1981). Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* *19*, 437–458.
- Haskó, G., Deitch, E.A., Németh, Z.H., Kuhel, D.G. et Szabó, C. (2002). Inhibitors of ATP-binding cassette transporters suppress interleukin-12 p40 production and major histocompatibility complex ii up-regulation in macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *301*, 103–110.
- Heisel, F., Miehe, J.A. et Sipp, B. (1979). Picosecond analysis of *trans*-stilbene fluorescence. *Chem. Phys. Lett.* *61*, 115–118.
- Hildreth, S.B., Gehman, E.A., Yang, H., Lu, R.H., Ritesh, K.C., Harich, K.C., Yu, S., Lin, J., Sandoe, J.L., Okumoto, S., Murphy, A.S. et Jelesko, J.G. (2011). Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *108*, 18179–18184.
- Hipskind, J.D. et Paiva, N.L. (2000). Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *13*, 551–562.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. et Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* *42*, 462–468.



Höll, J., Vannozzi, A., Czermel, S., D'Onofrio, C., Walker, A.R., Rausch, T., Lucchin, M., Boss, P.K., Dry, I.B. et Bogs, J. (2013). The R2R3-MYB transcription factors MYB14 and MYB15 regulate stilbene biosynthesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell*. 25, 10 4135-4149.

Houillé, B. (2015). Valorisation de coproduits de la viticulture, les saremments de vigne, comme source de polyphénols à activité fongicide. Thèse, Université François-Rabelais de Tours.

Houillé, B., Papon, N., Boudesocque, L., Bourdeaud, E., Besseau, S., Courdavault, V., Enguehard-Gueiffier, C., Delanoue, G., Guérin, L., Bouchara, J.-P., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., Guillard, J. et Lanoue, A. (2014). Antifungal activity of resveratrol derivatives against *Candida* species. *J. Nat. Prod.* 77, 1658–1662.

Houillé, B., Besseau, S., Delanoue, G., Oudin, A., Papon, N., Clastre, M., Simkin, A.J., Guérin, L., Courdavault, V., Giglioli-Guivarc'h, N. et Lanoue A. (2015a). Composition and tissue-specific distribution of stilbenoids in grape canes are affected by downy mildew pressure in the vineyard. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8472–8477.

Houillé, B., Besseau, S., Courdavault, V., Oudin, A., Glévarec, G., Delanoue, G., Guérin, L., Simkin, A.J., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h N. et Lanoue A. (2015b). Biosynthetic origin of E-resveratrol accumulation in grape canes during postharvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1631–1638.

Huet, Y., Ele Ekouna, J.P., Caron, A., Mezreb, K., Boitel-Conti, M. et Guerineau, F. (2014) Production and secretion of a heterologous protein by turnip hairy roots with superiority over tobacco hairy roots. *Biotechnology Letters*, 36, 181-190.

Hüsken, A., Baumert, A., Milkowski, C., Becker, H.C., Strack, D., Möllers, C. (2005). Resveratrol glucoside (piceid) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 111, 1553–1562.

Hwang, D. et Lim, Y.-H. (2015). Resveratrol antibacterial activity against *Escherichia coli* is mediated by Z-ring formation inhibition via suppression of FtsZ expression. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep10029.





Isaeva, G.A. et Kiselev, K.V. (2010). Regulation of resveratrol biosynthesis in grape cell cultures by salicylic acid and *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes*. J. Biotechnol. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.730

Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Huguency, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.-F., Weissenbach, J., Quétier, F. et Wincker, P. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463–467.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218–220.

Jasi ski, M., Stukkens, Y., Degand, H., Purnelle, B., Marchand-Brynaert, J. et Boutry, M. (2001). A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell*. 13, 1095–1107.

Jeandet, P., Bessis, R. et Gautheron, B. (1991). The Production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 41–46.

Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. et Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731–2741.

Jeandet, P., Delaunois, B., Conreux, A., Donnez, D., Nuzzo, V., Cordelier, S., Clément, C. et Courot, E. (2010). Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors* 36, 331–341.



Jeandet, P., Delaunois, B., Aziz, A., Donnez, D., Vasserot, Y., Cordelier, S. et Courot, E. (2012). Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2012/579089

Jeandet, P., Clément, C., Tisserant, L.-P., Crouzet, J. et Courot, É. (2016) Use of grapevine cell cultures for the production of phytoestrogens of cosmetic interest. *CR Chim.* doi:10.1016/j.crci.2016.02.013

Jeffrey, J.L. et Sarpong, R. (2009). An approach to the synthesis of dimeric resveratrol natural products via a palladium-catalyzed domino reaction. *Tetrahedron Lett.* 50, 1969–1972.

Jelesko, J.G. (2012).. An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism. *Front Plant Sci.* 3, 78-82.

Jones, P. et Vogt, T. (2001). Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 213, 164–174.

Jones, J.D.G. et Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.

Joseph, J.A., Fisher, D.R., Cheng, V., Rimando, A.M. et Shukitt-Hale, B. (2008). Cellular and behavioral effects of stilbene resveratrol analogues: implications for reducing the deleterious effects of aging. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10544–10551.

Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E. et Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 2355–2360.

Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y. et Martinoia, E. (2011). Plant ABC transporters. *Arabidopsis Book.* 9 ,e0153

Kato, K., Shitan, N., Shoji, T. et Hashimoto, T. (2015). Tobacco NUP1 transports both tobacco alkaloids and vitamin B6. *Phytochemistry.* 113, 33–40.

Kato, K., Shoji, T. et Hashimoto, T. (2014). Tobacco nicotine uptake permease regulates the expression of a key transcription factor gene in the nicotine biosynthesis pathway. *Plant Physiol.* 166, 2195–2204.



Katsuyama, Y., Funa, N., Miyahisa, I. et Horinouchi, S. (2007). Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chem. Biol.* *14*, 613–621.

Kauffmann, S., Dorey S., et Baillieul, F. (2009). Vers une stratégie alternative de protection des cultures. *Biofutur.* *296*, 26-30.

Keylor, M.H., Matsuura, B.S. et Stephenson, C.R.J. (2015). Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products. *Chem. Rev.* *115*, 8976–9027.

Khanduja, K.L. et Bhardwaj, A. (2003). Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared *in vitro* with some other bioflavonoids. *Indian J. Biochem. Biophys.* *40*, 416–422.

Khorodova, N. (2011). *Corydalis bracteata* (Fumariaceae) et approche du métabolisme secondaire au cours du développement. Thèse, Université de Picardie Jule Vernes.

Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V.P., Fedoreyev, S.A. et Zhuravlev, Y.N. (2007). The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *J. Biotechnol.* *128*, 681–692.

Kim, J.S., Lee, S.Y. et Park, S.U. (2010a). Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology*, *7*, 3788-3790.

Kim, H.-H., Popova, E.V., Yi, J.-Y., Cho, G.-T., Park, S.-U., Lee, S.-C. et Engelmann, F. (2010b). Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (Nakai) using a droplet-vitrification procedure. *Cryo Letters* *31*, 473–484.

Kitamura, S., Oono, Y. et Narumi, I. (2016). *Arabidopsis pab1*, a mutant with reduced anthocyanins in immature seeds from banyuls, harbors a mutation in the MATE transporter FFT. *Plant Mol Biol.* *90*, 7–18.

Klotter, F. et Studer, A. (2014). Total synthesis of resveratrol-based natural products using a palladium-catalyzed decarboxylative arylation and an oxidative Heck reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* *53*, 2473–2476.



- Kobayashi, S., Ding, C.K., Nakamura, Y., Nakajima, I. et Matsumoto, R. (2000). Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratrol-glucoside). *Plant Cell Rep.* 19, 904–910.
- Kodan, A., Kuroda, H. et Sakai, F. (2002). A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3335–3339.
- Koukol, J. et Conn, E.E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236, 2692–2698.
- Kreuzaler, F. et Hahlbrock, K. (1972). Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5,7,4-trihydroxyflavanone) from *p*-coumaroyl coenzyme A and malonyl coenzyme A. *FEBS Lett.* 28, 69–72.
- Ku, K.-L., Chang, P.-S., Cheng, Y.-C. et Lien, C.-Y. (2005). Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3877–3881.
- Lam, E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 305–315.
- Lambert, C., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Papastamoulis, Y., Richard, T., Corio-Costet, M.-F., Mérillon, J.-M. et Cluzet, S. (2012). Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the *Botryosphaeriaceae* family. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11859–11868.
- Lambert, C., Richard, T., Renouf, E., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Bordenave, L., Ollat, N., Mérillon, J.-M. et Cluzet, S. (2013). Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 61, 11392–11399.
- Landgraf, R., Smolka, U., Altmann, S., Eschen-Lippold, L., Senning, M., Sonnewald, S., Weigel, B., Frolova, N., Strehmel, N., Hause, G., Scheel, D., Böttcher, C. et Rosahl, S. (2014). The ABC transporter ABCG1 is required for suberin formation in potato tuber periderm. *Plant Cell.* 26, 3403–3415.





- Langcake, P. (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, -viniferin, -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* 18, 213–226.
- Langcake, P. et Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77–86.
- Langcake, P. et Pryce, R.J. (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33, 151–152.
- Langcake, P. et Pryce, R.J. (1977b). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* 16, 1193–1196.
- Lange, B.M., Trost, M., Heller, W., Langebartels, C. et Sandermann H. Jr, (1994). Elicitor-induced formation of free and cell-wall-bound stilbenes in cell-suspension cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Planta* 194, 143–148.
- Leckband, G. et Lörz, H. (1998). Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor. Appl. Genet.* 96, 1004–1012.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W. et Lee, Y. (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 138, 827–836.
- Le Hir, R., Sorin, C., Chakraborti, D., Moritz, T., Schaller, H., Tellier, F., Robert, S., Morin, H., Bako, L. et Bellini, C. (2013). ABCG9, ABCG11 and ABCG14 ABC transporters are required for vascular development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 76, 811–824.
- Lepoivre, P. (2003). *Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Université De Boeck (Bruxelles, Belgique). Ed. : De Boeck Supérieur
- Lesniewska, E., Adrian, M., Klinguer, A. et Pugin, A. (2004). Cell wall modification in grapevine cells in response to UV stress investigated by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 100, 171–178.
- Li, L., Henry, G.E. et Seeram, N.P. (2009). Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7282–7287.



- Li, L., Li, D., Liu, S., Ma, X., R., C.R., Hu, H-C., Zhang, G., Liu, Z., Zheng, J., Wang, G. et Schnable, P.S. (2013). The maize *glossy13* gene, cloned via BSR-Seq and Seq-walking encodes a putative ABC transporter required for the normal accumulation of epicuticular waxes. PLoS One. 8, e82333.
- Liang, H., Zheng, J., Duan, X., Sheng, B., Jia, S., Wang, D., Ouyang, J., Li, J., Li, L., Tian, W. *et al.* (2000). A transgenic wheat with a stilbene synthase gene resistant to powdery mildew obtained by biolistic method. Chin. Sci. Bull. 45, 634–638.
- Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martinez-Zapater, J.M., Bru, R. et Pedreno, M.A. (2008). Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. BMC Res. Notes 1, 132-139.
- Likhtenshtein, G. (2009). Stilbenes: applications in chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, doi: 10.1002/9783527628087
- Lim, C.G., Fowler, Z.L., Hueller, T., Schaffer, S. et Koffas, M.A.G. (2011). High-yield resveratrol production in engineered *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3451–3460.
- Lim, J.D., Yun, S.J., Chung, I.M. et Yu, C.Y. (2005). Resveratrol synthase transgene expression and accumulation of resveratrol glycoside in *Rehmannia glutinosa*. Mol. Breed. 16, 219–233.
- Lin, H.-S., Yue, B.-D. et Ho, P.C. (2009). Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. Biomed. Chromatogr. 23, 1308–1315.
- Lindl, T., Kreuzaler, F. et Hahlbrock, K. (1973). Synthesis of *p*-coumaroyl coenzyme a with a partially purified *p*-coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). Biochim. Biophys. Acta 302, 457–464.
- Liswidowati, Melchior, F., Hohmann, F., Schwer, B. et Kindl, H. (1991). Induction of stilbene synthase by *Botrytis cinerea* in cultured grapevine cells. Planta 183, 307–314.



- Liu, S., Hu, Y., Wang, X., Zhong, J. et Lin, Z. (2006). High content of resveratrol in lettuce transformed with a stilbene synthase gene of *Parthenocissus henryana*. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 8082–8085.
- Liu, C., Towler, M.J., Medrano, G., Cramer, C.L. et Weathers, P.J. (2009). Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor. *Biotechnol. Bioeng.* *102*, 1074–1086.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. et Darnell, J. (2000). Section 15.5. Active transport by ATP-powered pumps. *Molecular Cell Biology*, 4th edition, ISBN-10: 0-7167-3136-3
- Lu, D., Zhao W., Zhu, K. et Zhao, S. (2012). Relevant enzymes, genes and regulation mechanisms in biosynthesis pathway of stilbenes. *Open J. Med. Chem.* *2*, 15–23.
- Lucas-Abellán, C., Fortea, I., López-Nicolás, J.M. et Núñez-Delicado, E. (2007). Cyclodextrins as resveratrol carrier system. *Food Chem.* *104*, 39–44.
- Lucht, J.M. (2015). Public acceptance of plant biotechnology and GM crops. *Viruses* *7*, 4254–4281.
- Luo, B., Xue, X.Y., Hu, W.L., Wang, L.J. et Chen, X.Y. (2007). An ABC transporter gene of *Arabidopsis thaliana*, *AtWBC11*, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion. *Plant Cell Physiol.* *48*, 1790–1802.
- Ma, X., Sela, H., Jiao, G., Li, C., Wang, A., Pourkheirandish, M., Weiner, D., Sakuma, S., Krugman, T., Nevo, E., Komatsuda, T., Korol, A. et Chen, G. (2012). Population-genetic analysis of HvABCG31 promoter sequence in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). *BMC Evol. Biol.* *12*, 188.
- Mackey, D. et McFall, A.J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Mol. Microbiol.* *61*, 1365–1371.
- Madsen, S.R., Olsen, C.E., Nour-Eldin, H.H. et Halkier, B.A. (2014). Elucidating the role of transport processes in leaf glucosinolate distribution. *Plant Physiol.* *166*, 1450–1462.
- Mairet, F., Villon, P., Boitel-Conti, M. et Shakourzadeh, K. (2010). Modeling and optimization of hairy root growth in fed-batch process. *Biotechnol. Prog.* *26*, 847–856.



- Makhzoum, A., Pooja Sharma, P., Bernards, M.A. et Jocelyne Trémouillaux-Guiller, J. (2012). Hairy roots: an ideal platform for transgenic plant production and other promising applications. doi: 10.1007/978-1-4614-4066-6\_6
- Manela, N., Oliva, M., Ovadia, R., Sikron-Persi, N., Ayenew, B., Fait, A., Galili, G., Perl, A., Weiss, D. et Oren-Shamir, M. (2015). Phenylalanine and tyrosine levels are rate-limiting factors in production of health promoting metabolites in *Vitis vinifera* cv. Gamay Red cell suspension. Front. Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2015.00538.
- Marienhagen, J. et Bott M. (2013). Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. J. Biotech. 163, 166–178
- Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwarz, M., Barron, D., Routaboul, J.M., Debeaujon, I. et Klein, M. (2007). The arabidopsis MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H<sup>+</sup>-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. Plant Cell. 19, 2023–2038.
- Martinez-Esteso, M.J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J.C., Pedreño, M.A. et Bru-Martinez, R. (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. J. Proteomics 73, 331–341.
- Martinez-Esteso, M.J., Sellés-Marchart, S., Vera-Urbina, J.C., Pedreño, M.A. et Bru-Martinez, R. (2011). DIGE analysis of proteome changes accompanying large resveratrol production by grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to methyl- $\beta$ -cyclodextrin and methyl jasmonate elicitors. J. Proteomics 74, 1421–1436.
- Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J. et Wagner, D.R. (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. Plant Cell. 15, 1689–1703.
- McCormack, D. et McFadden, D. (2013). A review of pterostilbene antioxidant activity and disease modification. Oxid. Med. Cell. Longev. doi: 10.1155/2013/575482.
- McFarlane, H.E., Shin, J.J.H., Bird, D.A. et Samuelsen, L. (2010). *Arabidopsis* ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. Plant Cell. 22, 3066–3075.





- McTavish, D. et Sorkin, E.M. (1989). Verapamil. An updated review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in hypertension. *Drugs* 38, 19–76.
- Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A.M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O’Keefe, S.F., Bennett, S. et Dolan, M.C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* 68, 1992–2003.
- Melin, P., Hosy, E., Vivaudou, M. et Becq, F. (2007). CFTR inhibition by glibenclamide requires a positive charge in cytoplasmic loop three. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768, 2438–2446.
- Mérillon, J.-M., Fauconneau, B., Teguo, P.W., Barrier, L., Vercauteren, J. et Huguet, F. (1997). Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Clin. Chem.* 43, 1092–1093.
- Mehrotra, S., Rahman, L.U. et Kukreja, A.K. (2010). An extensive case study of hairy-root cultures for enhanced secondary-metabolite production through metabolic-pathway engineering. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 56, 161–172.
- Mehrotra, S., Prakash, O., Khan, F. et Kukreja, A.K. (2013a). Efficiency of neural network-based combinatorial model predicting optimal culture conditions for maximum biomass yields in hairy root cultures. *Plant Cell Rep.* 32, 309–317.
- Mehrotra, S., Goel, M.K., Rahman, L.U. et Kukreja, A.K. (2013b). Molecular and chemical characterization of plants regenerated from Ri-mediated hairy root cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* 114, 31–38.
- Mehrotra, S., Srivastava, V., Rahman, L.U. et Kukreja, A.K. (2015). Hairy root biotechnology—indicative timeline to understand missing links and future outlook. *Protoplasma* 252, 1189–1201.
- Meyer, S., De Angeli, A., Fernie, A.R. et Martinoia, E. (2010) Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends Plant Sci.* 15, 40–47
- Mikstacka, R., Przybylska, D., Rimando, A.M. et Baer-Dubowska, W. (2007). Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 and CYP1B1 by *trans*-resveratrol methyl ethers. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 517–524.



- Mizuno, H., Kawahigashi, H., Ogata, J., Minami, H., Kanamori, H., Nakagawa, H. et al. (2013). Genomic inversion caused by gamma irradiation contributes to downregulation of a WBC11 homolog in bloomless *Sorghum*. *Theor. Appl. Genet.* 126, 1513–1520.
- Mizutani, M., Ohta, D. et al. (1997). Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner *in planta*. *Plant Physiol.* 113, 755–763.
- Morales, M., Alcántara, J. et al. (1997). Oxidation of *trans*-resveratrol by a hypodermal peroxidase isoenzyme from Gamay rouge grape (*Vitis vinifera*) berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 33–38.
- Morelli, R., Das, S., Bertelli, A., Bollini, R., Scalzo, R.L., Das, D.K. et al. (2006). The introduction of the stilbene synthase gene enhances the natural antiradical activity of *Lycopersicon esculentum* mill. *Mol. Cell. Biochem.* 282, 65–73.
- Moreno-Manas, M. et al. (1985) Dehydroacetic acid chemistry. A new synthesis of resveratrol, a photoalexin of *Vitis Vinifera*. *Anal. Quim.* 81, 157-161.
- Morita, H., Noguchi, H., Schröder, J. et al. (2001). Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase. *Eur. J. Biochem.* 268, 3759–3766.
- Morita, M., Shitan, N., Sawada, K., Van Montagu, M.C.E., Inzé, D., Rischer, H., Goossens, A., Oksman-Caldentey, K-M., Moriyama, Y. et al. (2009). Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 2447–2452.
- Murthy, H.N., Lee, E.-J. et al. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 118, 1–16.
- Nedelkoska, T.V. et al. (2000). Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 607–615.
- Nicoletti, I., De Rossi, A., Giovinazzo, G. et al. (2007). Identification and quantification of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum*



Mill.) by reversed phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3304–3311.

Nopo-Olazabal, C., Hubstenberger, J., Nopo-Olazabal, L. et Medina-Bolivar, F. (2013). Antioxidant activity of selected stilbenoids and their bioproduction in hairy root cultures of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.). *J. Agric. Food Chem.* 61, 11744–11758.

Nopo-Olazabal, C., Condori, J., Nopo-Olazabal, L. et Medina-Bolivar, F. (2014). Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of *Vitis rotundifolia* treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Physiol. Biochem.* 74, 50–69.

Nour-Eldin, H.H., Andersen, T.G., Burow, M., Madsen, S.R., Jørgensen, M.E., Olsen, C.E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D., Halkier B.A. (2012). NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature.* 488, 531–534.

Nour-Eldin, H.H., Andersen, T.G., Burow, M., Madsen, S.R., Jørgensen, M.E., Olsen, C.E., Dreyer, I., Hedrich, R., Geiger, D. et Halkier, B.A. (2012). NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature.* 488, 531–534.

Nour-Eldin, H.H. et Halkier, B.A. (2013). The emerging field of transport engineering of plant specialized metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 263–270.

Obembe, O.O., Popoola, J.O., Leelavathi, S. et Reddy, S.V. (2011). Advances in plant molecular farming. *Biotechnol. Adv.* 29, 210–222.

Ono, N.N. et Tian, L. (2011). The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities. *Plant Sci.* 180, 439–446.

Palavalli, R.R., Srivastava, S. et Srivastava, A.K. (2012). Development of a mathematical model for growth and oxygen transfer in in vitro plant hairy root cultivations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 1831–1844.

Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R.B., Höfer, R., Schreiber, L., Chory J. et Aharoni, A. (2007). The *Arabidopsis* DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol.* 145, 1345–1360.



- Panikashvili, D., Shi, J.X., Bocobza, S., Franke, R.B., Schreiber, L. et Aharoni, A. (2010). The *Arabidopsis* DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Mol. Plant.* 3, 563–575.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Schreiber, L. et Aharoni, A. (2011). The *Arabidopsis* ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytol.* 190, 113–124.
- Paulo L., Oleastro, M., Gallardo, E., Queiroz, J. A., Domingues F., (2011). Antimicrobial properties of resveratrol: a review. *Science against microbial pathogens.* 2, 1225-1235.
- Parage, C., Tavares, R., Réty, S., Baltenweck-Guyot, R., Poutaraud, A., Renault, L., Heintz, D., Lugan, R., Marais, G.A.B., Aubourg, S. *et al.* (2012). Structural, functional, and evolutionary analysis of the unusually large stilbene synthase gene family in grapevine. *Plant Physiol.* 160, 1407–1419.
- Parage, C. (2013). Génomique fonctionnelle de la biosynthèse des stilbènes chez la vigne (*Vitis vinifera*). Thèse, Université de Strasbourg.
- Park, H., Kim, J., Park, J.-H., Baek, N.-I., Park, C.-S., Lee, H.-S. et Cha, J. (2012). Bioconversion of piceid to piceid glucoside using amylosucrase from *Alteromonas macleodii* deep ecotype. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1698–1704.
- Park, S.R., Yoon, J.A., Paik, J.H., Park, J.W., Jung, W.S., Ban, Y.-H., Kim, E.J., Yoo, Y.J., Han, A.R. et Yoon, Y.J. (2009). Engineering of plant-specific phenylpropanoids biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. *J. Biotechnol.* 141, 181–188.
- Pawlus, A.D., Sahli, R., Bisson, J., Rivière, C., Delaunay, J.-C., Richard, T., Gomès, E., Bordenave, L., Waffo-Téguo, P. et Méryllon, J.-M. (2013). Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* Species. *J. Agric. Food Chem.* 61, 501–511.
- Peebles, C.A.M., Hughes, E.H., Shanks, J.V. et San, K.-Y. (2009). Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of *ORCA3* along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time. *Metab. Eng.* 11, 76–86.
- Pérez-Díaz, R., Ryngajllo, M., Pérez-Díaz, J., Peña-Cortés, H., Casaretto, J.A., González-Villanueva, E. et Ruiz-Lara, S. (2014). VvMATE1 and VvMATE2 encode putative





proanthocyanidin transporters expressed during berry development in *Vitis vinifera* L. *Plant Cell Rep.* 33, 1147–1159.

Pervaiz, S. et Holme, A.L. (2009). Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2851–2897.

Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. et Vianello, A. (2013). Plant flavonoids - biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14950–14973.

Pezzuto, J.M. (2011). The phenomenon of resveratrol: redefining the virtues of promiscuity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, 123–130.

Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S. et Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5, 308–316.

Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., and Bakker, P.A.H.M. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347–375.

Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, I.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L. et Samuels, A.L. (2004). Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science.* 306, 702–704.

Pool R.M., Creasy L.L. et Frackelton A.S. (1981). Resveratrol and the viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs. *Vitis.* 20, 136–145.

Poutaraud, A., Latouche, G., Martins, S., Meyer, S., Merdinoglu, D. et Cerovic, Z.G. (2007). Fast and local assessment of stilbene content in grapevine leaf by *in vivo* fluorometry. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4913–4920.

Poutaraud, A., Latouche, G., Cerovic, Z.G. et Merdinoglu, D. (2010). Quantification of stilbene in grapevine leaves by direct fluorometry and high performance liquid chromatography: spatial localisation and time course of synthesis. *Special Issue Macrowine* 27-32.

Pribat, A., Noiriel, A., Morse, A.M., Davis, J.M., Fouquet, R., Loizeau, K., Ravel, S., Frank, W., Haas, R., Reski, R., Bedair, M., Sumner, L.W. et Hanson, A.D. (2010).



Nonflowering plants possess a unique folate-dependent phenylalanine hydroxylase that is localized in chloroplasts. *Plant Cell* 22, 3410–3422.

Qin, P., Tu B., Wang, Y., Deng, L., Quilichini, T.D., Li, T., Wang, H., Ma, B., Li, S. (2013). *ABCG15* encodes an ABC transporter protein, and is essential for post-meiotic anther and pollen exine development in rice. *Plant Cell Physiol.* 54, 138–154.

Qiu-Hong Pan, L.W. (2009). Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. *Plant Sci.* 176, 360–366.

Qu, J., Zhang, W., Yu, X. et Jin, M. (2005). Instability of anthocyanin accumulation in *Vitis vinifera* L. var. Gamay Fréaux suspension cultures. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10, 155–161.

Qu, J., Zhang, W., Hu, Q. et Jin, M. (2006). Impact of subculture cycles and inoculum sizes on suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Chin. J. Biotechnol.* 22, 984–989.

Quilichini, T.D., Samuels, A.L. et Douglas, C.J. (2014). ABCG26-mediated polyketide trafficking and hydroxycinnamoyl spermidines contribute to pollen wall exine formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 26, 4483–4498.

Rausher, M.D. (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411, 857–864.

Rasheed A., Kumar, A., S et Ravanthi, V. (2008). Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review. *Sci. Pharm.* 76, 567–598.

Rasmussen, S. et Dixon, R. (1999). Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 11, 1537–1552.

Rayne, S., Karacabey, E. et Mazza, G. (2008). Grape cane waste as a source of *trans*-resveratrol and *trans*-viniferin: high-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Ind. Crops Prod.* 27, 335–340.

Rege, S.D., Geetha, T., Griffin, G.D., Broderick, T.L. et Babu, J.R. (2014). Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Front. Aging Neurosci.* 6, 218-229.



- Reis Giada, M. de L. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. In : Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants, J.A. Morales-Gonzalez, ed. (InTech). 87-112.
- Renaud, S., de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523-1526.
- Rhodes, M.J.C., Hilton, M., Parr, A.J., Hamill, J.D. et Robins, R.J. (1986). Nicotine production by hairy root cultures of *Nicotiana rustica*: Fermentation and product recovery. *Biotechnol. Lett.* 8, 415–420.
- Richter, A., Jacobsen, H.-J., Kathen, A. de, Lorenzo, G. de, Briviba, K., Hain, R., Ramsay, G. et Kiesecker, H. (2006). Transgenic peas (*Pisum sativum*) expressing polygalacturonase inhibiting protein from raspberry (*Rubus idaeus*) and stilbene synthase from grape (*Vitis vinifera*). *Plant Cell Rep.* 25, 1166–1173.
- Riedel, H., Akumo, D.N., Saw, N., Kütük, O., Neubauer, P. et Smetanska, I. (2014). Elicitation and precursor feeding influence phenolic acids composition in *Vitis vinifera* suspension culture. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 3000–3008.
- Rimando, A.M., Nagmani, R., Feller, D.R. et Yokoyama, W. (2005). Pterostilbene, a new agonist for the peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -isoform, lowers plasma lipoproteins and cholesterol in hypercholesterolemic hamsters. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3403–3407.
- Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V. et Mysore, K.S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front. Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2014.00017.
- Roleira, F.M.F., Tavares-da-Silva, E.J., Varela, C.L., Costa, S.C., Silva, T., Garrido, J. et Borges, F. (2015). Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chem.* 183, 235–258.
- Rolfs, C.H. et Kindl, H. (1984). Stilbene synthase and chalcone synthase: two different constitutive enzymes in cultured cells of *Picea excelsa*. *Plant Physiol.* 75, 489–492.
- Ros Barcelo, A., Pomar, F., Lopez-Serrano, M. et Pedreno, M.A. (2003) Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Funct. Plant Biol.* 30, 577–591.



- Rösler, J., Krekel, F., Amrhein, N. et Schmid, J. (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* *113*, 175–179.
- Roupe, K., Remsberg, C., Yanez, J. et Davies, N. (2006). Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.* *1*, 81–101.
- Rühmann, S., Treutter, D., Fritsche, S., Briviba, K. et Szankowski, I. (2006). Piceid (resveratrol glucoside) synthesis in stilbene synthase transgenic apple fruit. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 4633–4640.
- Russell, D.W. et Conn, E.E. (1967). The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* *122*, 256–258.
- Saito, H., Oikawa, T., Hamamoto, S., Ishimaru, Y., Kanamori-Sato, M., Sasaki-Sekimoto, Y., Utsumi, T., Chen, J., Kanno, Y., Masuda, S., Kamiya, Y., Seo, M., Uozumi, N., Ueda, M. et Ohta H. (2015). The jasmonate-responsive GTR1 transporter is required for gibberellin-mediated stamen development in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* *6*, doi: 10.1038/ncomms7095.
- Santos, J.A., de Carvaho, G.S.G., Oliveira, V., Raposo, N.R.B. et da Silva, A.D. (2013). Resveratrol and analogues: a review of antioxidant activity and applications to human health. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* *5*, 144–153.
- Sasabe, M., Toyoda, K., Shiraishi, T., Inagaki, Y., Ichinose, Y., (2002). cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett.* *518*, 164–168.
- Sathiyamoorthy, S., In, J.G., Gayathri, S., Kim, Y.J. et Yang, D.C. (2010). Gene ontology study of methyl jasmonate-treated and non-treated hairy roots of *Panax ginseng* to identify genes involved in secondary metabolic pathway. *Genetika* *46*, 932–939.
- Satiat-Jeunemaitre, B. et Hawes, C. (1993). Insights into the secretory pathway and vesicular transport in plant cells. *Biol. Cell* *79*, 7–15.
- Schenke, D., Sasabe, M., Toyoda, K., Inagaki, Y.S., Shiraishi, T., Ichinose, Y. (2003). Genomic structure of the *NtPDR1* gene, harboring the two miniature inverted-repeat transposable elements, *NtToyal* and *NtStowaway101*. *Genes Genet. Syst.* *78*, 409–418.





Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D. et Hugueney, P. (2008). A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiol.* *148*, 1630–1639.

Schöppner, A. et Kindl, H. (1984). Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *J. Biol. Chem.* *259*, 6806–6811.

Schwekendiek, A., Spring, O., Heyerick, A., Pickel, B., Pitsch, N.T., Peschke, F., de Keukeleire, D. et Weber, G. (2007). Constitutive expression of a grapevine stilbene synthase gene in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) yields resveratrol and its derivatives in substantial quantities. *J. Agric. Food Chem.* *55*, 7002–7009.

Seppänen, S.-K., Syrjälä, L., von Weissenberg, K., Teeri, T.H., Paajanen, L. et Pappinen, A. (2004). Antifungal activity of stilbenes in *in vitro* bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase. *Plant Cell Rep.* *22*, 584–593.

Serazetdinova, L., Oldach, K.H. et Lörz, H. (2005). Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *J. Plant Physiol.* *162*, 985–1002.

Shams, M., Vial, L., Chapulliot, D., Nesme, X. et Lavire, C. (2013). Rapid and accurate species and genomic species identification and exhaustive population diversity assessment of *Agrobacterium* spp. using recA-based PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* *36*, 351–358.

Shen, T., Wang, X.-N. et Lou, H.-X. (2009). Natural stilbenes: an overview. *Nat. Prod. Rep.* *26*, 916–935.

Shibuya, N. et Minami, E. (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *59*, 223–233.

Shin, S.-Y., Jung, S.-M., Kim, M.-D., Han, N.S. et Seo, J.-H. (2012). Production of resveratrol from tyrosine in metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* *51*, 211–216.

Shinde, A.N., Malpathak, N. et Fulzele, D.P. (2009). Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* *14*, 288–294.



Shiono, K., Ando, M., Nishiuchi, S., Takahashi, H., Watanabe, K., Nakamura, M., Matsuo, Y., Yasuno, N., Yamanouchi, U., Fujimoto, M., Takanashi, H., Ranathunge, K., Franke, R.B., Shitan, N., Nishizawa, N.K., Takamura, I., Yano, M., Tsutsumi, N., Schreiber, L., Yazaki, K., Nakazono, M., Kato, K. (2014). RCN1/OsABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza sativa*). *Plant J.* 80, 40–51.

Shitan, N., Bazin, I., Dan, K., Obata, K., Kigawa, K., Ueda, K., Sato, F., Forestier, C., Yazaki, K. (2003). Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 751–756.

Shitan, N., Minami, S., Morita, M., Hayashida, M., Ito, S., Takanashi, K., Omote, H., Moriyama, Y., Sugiyama, A., Goossens, A., Moriyasu, M., Yazaki, K. (2004). Involvement of the leaf-specific multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter Nt-JAT2 in vacuolar sequestration of nicotine in *Nicotiana tabacum*. *PLoS One.* 9, e108789.

Shitan, N., Kiuchi, F., Sato, F., Yazaki, K., Yoshimatsu, K. (2005). Establishment of *Rhizobium*-mediated transformation of *Coptis japonica* and molecular analyses of transgenic plants. *Plant Biotechnol.* 22, 113–118.

Shitan, N., Morita, M., Yazaki, K. (2009). Identification of a nicotine transporter in leaf vacuoles of *Nicotiana tabacum*. *Plant Signal Behav.* 4, 530–532.

Shitan, N., Dalmas, F., Dan, K., Kato, N., Ueda, K., Sato, F., Forestier, C., Yazaki, K. (2013). Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport. *Phytochemistry.* 91, 109–116.

Shitan, N., Hayashida, M., Yazaki, K. (2015). Translocation and accumulation of nicotine via distinct spatio-temporal regulation of nicotine transporters in *Nicotiana tabacum*. *Plant Signal Behav.* 10, e1035852.

Shitan, N. (2016). Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* doi:10.1080/09168451.2016.1151344

Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., Yazaki, K., Goto, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Hashimoto, T. (2009). Multidrug and toxic compound extrusion-



type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiol.* 149, 708–718.

Shoji, T. (2014). ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants: a common theme among diverse detoxification mechanisms. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 309, 303–346.

Showalter, A.M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9–23.

Shumakova, O.A., Manyakhin, A.Y. et Kiselev, K.V. (2011). Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with coumaric acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165, 1427–1436.

Snyder, S.A. (2011a). Synthetic approaches to the resveratrol-based family of oligomeric natural products. In: *Biomimetic organic synthesis*, E. Poupon et B. Nay, eds., 695–721.

Snyder, S.A., Zografos, A.L. et Lin, Y. (2007). Total synthesis of resveratrol-based natural products: a chemoselective solution. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 8186–8191.

Snyder, S.A., Gollner, A. et Chiriac, M.I. (2011b). Regioselective reactions for programmable resveratrol oligomer synthesis. *Nature* 474, 461–466.

Sobolev, V.S., Guo, B.Z., Holbrook, C.C. et Lynch, R.E. (2007). Interrelationship of phytoalexin production and disease resistance in selected peanut genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2195–2200.

Sosa Alderete, L. G., Ibáñez, S. G., Agostini, E., et Medina, M. I. (2012) Phytoremediation of phenol at pilot scale by tobacco hairy roots. 3, 398-407.

Späth, E. et Kromp, K. (1941). Über die Inhaltsstoffe des roten Sandelholzes. III. Mitteil.: die synthese des pterostilbens. *Chem. Ber.* 74(2), 189-192

Sprouse, D. (2009). The synthesis of resveratrol. A senior paper submitted for the degree of Bachelor of science school of science and engineering oral. Roberts University.

Sriram, G., Fulton, D.B. et Shanks, J.V. (2007). Flux quantification in central carbon metabolism of *Catharanthus roseus* hairy roots by <sup>13</sup>C labeling and comprehensive bondomer balancing. *Phytochemistry* 68, 2243–2257.



Srivastava, V., Negi, A.S., Ajayakumar, P.V., Khan, S.A. et Banerjee, S. (2012). *Atropa belladonna* hairy roots: orchestration of concurrent oxidation and reduction reactions for biotransformation of carbonyl compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166, 1401–1408.

Srivastava, V., Kaur, R., Chattopadhyay S.K. et Banerjee, S. (2013). Production of industrially important cosmaceutical and pharmaceutical derivatives of betuligenol by *Atropa belladonna* hairy root mediated biotransformation. 44, 171–175.

Stark-Lorenzen, P., Nelke, B., Hänßler, G., Mühlbach, H.P. et Thomzik, J.E. (1997). Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 16, 668–673.

Stenglein, S.A., Arambarri, A.M., Sevillano, M. del C.M. et Balatti, P.A. (2005). Leaf epidermal characters related with plant's passive resistance to pathogens vary among accessions of wild beans *Phaseolus vulgaris* var. aborigineus (*Leguminosae–Phaseoleae*). *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 200, 285–295.

Stukkens, Y., Bultreys, A., Grec, S., Trombik, T., Vanham, D. et Boutry, M. (2005) NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol.* 139, 341– 352

Sun, Y., Li, H., et Huang, J.-R. (2012). *Arabidopsis* TT19 functions as a carrier to transport anthocyanin from the cytosol to tonoplasts. *Mol. Plant* 5, 387–400.

Sydor, T., Schaffer, S. et Boles, E. (2010). Considerable increase in resveratrol production by recombinant industrial yeast strains with use of rich medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3361–3363.

Szankowski, I., Briviba, K., Fleschhut, J., Schönherr, J., Jacobsen, H.-J. et Kiesecker, H. (2003). Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Rep.* 22, 141–149.

Takanashi, K., Shitan, N. et Yazaki K. (2014) The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. *Plant Biotech.* 31, 417–430.

Takaya, Y., Terashima, K., Ito, J., He, Y.-H., Tateoka, M., Yamaguchi, N. et Niwa, M. (2005). Biomimic transformation of resveratrol. *Tetrahedron* 61, 10285–10290.





- Tang, K., Zhan, J.-C., Yang, H.-R. et Huang, W.-D. (2010). Changes of resveratrol and antioxidant enzymes during UV-induced plant defense response in peanut seedlings. *J. Plant Physiol.* 167, 95–102.
- Thompson, E.P., Davies, J.M., Glover, B.J. (2010). Identifying the transporters of different flavonoids in plants. *Plant Signal Behav.* 5, 860–863.
- Thompson, E.P., Wilkins, C., Demidchik, V., Davies, J.M. et J. Glover, B.J. (2009). An *Arabidopsis* flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. *J. Exp. Bot.* 61, 439–451.
- Thomzik, J.E., Stenzel, K., Stocker, R., Schreier, P.H., Hain, R. et Stahl, D.J. (1997). Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51, 265–278.
- Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 351–357.
- Thorpe, T.A. (2007). History of plant tissue culture. *Mol. Biotechnol.* 37, 169–180.
- Tian, W. Z., Ding L., Cao S. Y., Dai S. H., Ye S. Q. and Li L. C. (1998). Rice transformation with a phytoalexin gene and bioassay of the transgenic plants. *Acta Botanica Sinica*, 40, S511.103.
- Torregrosa, L. et Bouquet, A. (1997). *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens* co-transformation to obtain grapevine hairy roots producing the coat protein of grapevine chromosome mosaic nepovirus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 49, 53–62.
- Touno, K., Yoshimatsu, K. et Shimomura, K. (2006). Characteristics of *Atropa belladonna* hairy roots cryopreserved by vitrification method. *Cryo Letters* 27, 65–72.
- Trantas, E., Panopoulos, N. et Ververidis, F. (2009). Metabolic engineering of the complete pathway leading to heterologous biosynthesis of various flavonoids and stilbenoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 11, 355–366.
- Tzfira, T. et Citovsky, V. (2000). From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*–plant cell interaction. *Mol. Plant Pathol.* 1, 201–212.



- Ukitsu, H., Kuromori, T., Toyooka, K., Goto, Y., Matsuoka, K., Sakuradani, E., Shimizu, S., Kamiya, A., Imura, Y., Yuguchi, M., Wada, T., Hirayama, T. et Shinozaki, K. (2007). Cytological and biochemical analysis of COF1, an *Arabidopsis* mutant of an ABC transporter gene. *Plant Cell Physiol.* 48, 1524–1533.
- van Etten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A. et Farmer, E.E. (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins.” *Plant Cell* 6, 1191–1192.
- van den Brûle, S., Müller, A., Fleming, A.J. et Smart, C.C. (2002). The ABC transporter SpTUR2 confers resistance to the antifungal diterpene sclareol. *Plant J.* 30, 649–662.
- van Loon, L.C., Rep, M. et Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 135–162.
- Vannozzi, A., Dry, I.B., Fasoli, M., Zenoni, S. et Lucchin, M. (2012). Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biol.* 12, 130-151.
- Vastano, B.C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.-T., Zhou, Z. et Rosen, R.T. (2000). Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J. Agric. Food Chem.* 48, 253–256.
- Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Macke, S., Gorena, T. et Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* 60, 929–933.
- Verma, P., Khan, S.A., Mathur, A.K., Shanker, K. et Lal, R.K. (2014). Regulation of vincamine biosynthesis and associated growth promoting effects through abiotic elicitation, cyclooxygenase inhibition, and precursor feeding of bioreactor grown *Vinca minor* hairy roots. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 663–672.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P.A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E.J., Yazaki, K., Theodoulou, F.L. (2008). Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* 13, 151–159.



- Versari, A., Parpinello, G.P., Tornielli, G.B., Ferrarini, R. et Giulivo, C. (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *J. Agric. Food Chem.* *49*, 5531–5536.
- Wagner, G.J. (1991). Secreting glandular trichomes: more than just hairs. *Plant Physiol.* *96*, 675–679.
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.-R., Wen, P.-F., Zhang, P., Wang, H.-L. et Huang, W.-D. (2010). Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* *48*, 142–152.
- Wang, Y., Halls, C., Zhang, J., Matsuno, M., Zhang, Y. et Yu, O. (2011). Stepwise increase of resveratrol biosynthesis in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering. *Metab. Eng.* *13*, 455–463.
- Wang, Y. et Yu, O. (2012). Synthetic scaffolds increased resveratrol biosynthesis in engineered yeast cells. *J. Biotechnol.* *157*, 258–260.
- Wang, D.-G., Liu, W.-Y. et Chen, G.-T. (2013). A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*. *J. Pharm. Anal.* *3*, 241–247.
- Wang, J.W. et Wu, J.Y. (2013). Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* *134*, 55–89.
- Wang, Y., Jiang, Y., Fan, X., Tan, H., Zeng, H., Wang, Y., Chen, P., Huang, M. et Bi, H. (2015). Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1–p53 signaling pathways. *Toxicol. Lett.* *236*, 82–89.
- Wan Zuraida, W.M.Z., Norizan A., Nor Hazana N. et Nur Ainaa, A.M. N. (2011). The evaluation of antioxidant, antibacterial and structural identification activity of trimer resveratrol from Malaysia's *Dipterocarpaceae*. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* *5*, 926–929.
- Waterhouse, A.L. et Lamuela-Raventós, R.M. (1994). The occurrence of piceid, a stilbene glucoside, in grape berries. *Phytochemistry* *37*, 571–573.



- Watts, K.T., Lee, P.C. et Schmidt-Dannert, C. (2006). Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 6, 22-33.
- Wiese, W., Vornam, B., Krause, E. et Kindl, H. (1994). Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant Mol. Biol.* 26, 667–677.
- Wilkens, A., Paulsen, J., Wray, V. et Winterhalter, P. (2010). Structures of two novel trimeric stilbenes obtained by horseradish peroxidase catalyzed biotransformation of *trans*-resveratrol and (–)-*trans*-viniferin. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6754-6761.
- Wittstock, U. et Gershenzon, J. (2002). Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 300–307.
- Wong, D.C.J., Schlechter, R., Vannozzi, A., Höll, J., Hmam, I., Bogs, J., Tornielli, G.B., Castellarin, S.D. et Matus, J.T. (2016). A systems-oriented analysis of the grapevine R2R3-MYB transcription factor family uncovers new insights into the regulation of stilbene accumulation. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes*. Doi: 10.1093/dnares/dsw028
- Wongsamuth, R. et Doran, P.M. (1997). Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnol. Bioeng.* 54, 401–415.
- Wu, L., Guan, Y., Wu, Z., Yang, K., Lv, L., Converse, R., Huang, Y., Mao, J., Zhao, Y., Wang, Z., Min, H., Kan, D. et Zhang, Y. (2014). *OsABCG15* encodes a membrane protein that plays an important role in anther cuticle and pollen exine formation in rice. *Plant Cell Rep.* 33, 1881–1899.
- Xu, J., Yang, C., Yuan, Z., Zhang, D., Gondwe, M.Y., Ding, Z., Liang, W., Zhang, D. et Wilson, Z.A. (2010). The ABORTED MICROSPORES regulatory network is required for postmeiotic male reproductive development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 22, 91–107.
- Xue, S.-H., Luo, X.-J., Wu, Z.-H., Zhang, H.-L. et Wang, X.-Y. (2007). Cold storage and cryopreservation of hairy root cultures of medicinal plant *Eruca sativa*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 92, 251–260.





- Xue, Y.-Q., Di, J.-M., Luo, Y., Cheng, K.-J., Wei, X., Shi, Z. (2014). Resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers, resveratrol oligomers for the prevention and treatment of cancers. *Oxidative Med. Cell. Longev*, e765832.
- Yadav, V., Molina I., Ranathunge, K., Castillo, I.Q., Rothstein, S.J. et Reed, J.W. (2014). ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 26, 3569–3588.
- Yang, Y., Jittayasothorn, Y., Chronis, D., Wang, X., Cousins, P. et Zhong, G.-Y. (2013a). Molecular characteristics and efficacy of 16D10 siRNAs in inhibiting root-knot nematode infection in transgenic grape hairy roots. *PLoS ONE* 8. e69463.
- Yang, Z., Zhang, T., Lang, T., Li, G., Chen, G. et Nevo, E. (2013b). Transcriptome comparative profiling of barley *eibi1* mutant reveals pleiotropic effects of HvABCG31 gene on cuticle biogenesis and stress responsive pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 20478– 20491.
- Yazaki, K., Shitan, N., Takamatsu, H., Ueda, K. et Sato, F. (2001). A novel *Coptis japonica* multidrug-resistant protein preferentially expressed in the alkaloid-accumulating rhizome. *J. Exp. Bot.* 52, 877–879.
- Yazaki, K. (2005). Transporters of secondary metabolites. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 301–307.
- Yazaki, K., Shitan, N., Sugiyama, A., Takanashi, K. (2009). Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 276, 263–299.
- Yoo, H., Widhalm, J.R., Qian, Y., Maeda, H., Cooper, B.R., Jannasch, A.S., Gonda, I., Lewinsohn, E., Rhodes, D. et Dudareva, N. (2013). An alternative pathway contributes to phenylalanine biosynthesis in plants via a cytosolic tyrosine:phenylpyruvate aminotransferase. *Nature Commun.* 4, doi: 10.1038/ncomms3833
- Yu, C.K.Y., Springob, K., Schmidt, J., Nicholson, R.L., Chu, I.K., Yip, W.K. et Lo, C. (2005). A stilbene synthase gene (*SbSTS1*) is involved in host and nonhost defense Responses in *Sorghum*. *Plant Physiol.* 138, 393–401.
- Yu, C.K.Y., Lam, C.N.W., Springob, K., Schmidt, J., Chu, I.K. et Lo, C. (2006). Constitutive accumulation of *cis*-piceid in transgenic *Arabidopsis* overexpressing a *Sorghum* stilbene synthase gene. *Plant Cell Physiol.* 47, 1017–1021.



Yu, F. et De Luca, V. (2013). ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 110, 15830–15835.

Yue, X., Zhang, W. et Deng, M. (2011). Hyper-production of <sup>13</sup>C-labeled *trans*-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cell culture by elicitation and in situ adsorption. Biochem. Eng. J. 53, 292–296.

Zhang, Y., Li, S.-Z., Li, J., Pan, X., Cahoon, R.E., Jaworski, J.G., Wang, X., Jez, J.M., Chen, F. et Yu, O. (2006). Using unnatural protein fusions to engineer resveratrol biosynthesis in yeast and mammalian cells. J. Am. Chem. Soc. 128, 13030–13031.

Zhang, Z., Gao, L., Cheng, Y., Jiang, J., Chen, Y., Jiang, H., Yu, H., Shan, A., Cheng, B., Zhang, Z. (2014). Resveratrol, a natural antioxidant, has a protective effect on liver injury induced by inorganic arsenic exposure. BioMed Res. Int. e617202.

Zhao, J. et Dixon, R.A. (2009). MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. Plant Cell. 21, 2323–2340.

Zhao, J., Huhman, D., Shadle, G., He, X.Z., Sumner, L.W., Tang, Y. et Dixon, R.A. (2011). MATE2 mediates vacuolar sequestration of flavonoid glycosides and glycoside malonates in *Medicago truncatula*. Plant Cell. 23, 1536–1555.

Zhao, G., Shi, J., Liang, L., Xue, F., Luo, G., Zhu, L., Qu, G., Chen, M., Schreiber, L. et Zhang, D. (2013). The ATP-binding Cassette Transporter OsABCG15 is required for anther development and pollen fertility in rice. J. Integr. Plant Biol. 55, 710–720.

Zhao, B., Agblevor, F., Ritesh, K.C. et Jelesko, J. (2013). Enhanced production of the alkaloid nicotine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* L. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 113, 121–129

Zhao, G., Shi, J., Liang, W., Xue, F., Luo, Q., Zhu, L., Qu, G., Chen, M., Schreiber, L. et Zhang, D. (2015). Two ATP Binding Cassette G (ABCG) transporters, OsABCG26 and OsABCG15, collaboratively regulate rice male reproduction. Plant Physiol. 169, 2064–2079.



- Zhong, C., Liu, X.-H., Hao, X.-D., Chang, J. et Sun, X. (2013). Synthesis and biological evaluation of novel neuroprotective agents for paraquat-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells. *Eur. J. Med. Chem.* 62, 187–198.
- Zhou, M.-L., Zhu, X.-M., Shao, J.-R., Tang, Y.-X. et Wu, Y.-M. (2011). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1229–1239.
- Zhou, M.L., Tang, Y-X. et Wu, Y-M. (2013) Plant hairy roots for remediation of aqueous pollutants. *31*, 1-8.
- Zhu, Y.J., Agbayani, R., Jackson, M.C., Tang, C.S. et Moore, P.H. (2004). Expression of the grapevine stilbene synthase gene VST1 in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora*. *Planta* 220, 241–250.
- Zhu, L., Shi, J., Zhao, G., Zhang, D. et Liang, W. (2013). Post-meiotic deficient anther1 (*PDA1*) encodes an ABC transporter required for the development of anther cuticle and pollen exine in rice. *J. Plant Biol.* 56, 59–68.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G. et Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428, 764–767.



## **ANNEXES**

---





## **4<sup>ème</sup> Article: les cultures de cellules de vigne en suspension pour la production de stilbènes**

---





Account/Revue

## Use of grapevine cell cultures for the production of phytostilbenes of cosmetic interest



### *Utilisation de cultures cellulaires de vigne pour la production de phytostilbènes d'intérêt cosmétique*

Philippe Jeandet<sup>\*</sup>, Christophe Clément, Léo-Paul Tisserant, Jérôme Crouzet, Éric Courot

Unité de Recherche Vigne et Vin de Champagne EA 4707, Université de Reims Champagne-Ardenne, UFR Sciences, BP 1039, 51687 Reims cedex 2, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 27 November 2015

Accepted 15 February 2016

Available online 1 April 2016

##### Keywords:

Phytostilbenes  
Resveratrol  
Bioproduction  
Cell suspensions  
Cosmetics  
Grapevine

##### Mots clés:

Phytostilbènes  
Resvératrol  
Bioproduction  
Suspensions cellulaires  
Produits cosmétiques  
Vigne

#### ABSTRACT

Plant cell cultures constitute pesticide-free sources for obtaining plant secondary metabolites or plant extracts. Additionally, they do not contain any fungal contaminants, mycotoxins or heavy metals providing to the consumer potential health benefits and justifying the development of this technology at an industrial scale. Significant production levels of these secondary metabolites can be obtained through the use of elicitors, which activate plant defense mechanisms. Resveratrol, a well-known grapevine polyphenolic compound which possesses potent antioxidant and antiaging activities as well as a protective action on skin, is a good example of such plant secondary metabolites. Resveratrol and its oligomeric derivatives are used by several companies of cosmetic products but their extraction from vine stems and similar vegetal sources remains difficult. Therefore grapevine cell suspensions could represent interesting systems for the large-scale bioproduction of those compounds. Here we present an update of the methods used for the production of phytostilbenes by using grapevine cell cultures and the results obtained.

© 2016 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

#### R É S U M É

Les cultures cellulaires végétales constituent une source de métabolites secondaires ou d'extraits végétaux dénués de pesticides. De plus, celles-ci ne contiennent aucun contaminant fongique, aucune mycotoxine ou métal lourd, ce qui confère au produit une valeur santé vis-à-vis des consommateurs et justifie le développement au niveau industriel de cette technologie. De grandes quantités de ces métabolites secondaires sont obtenues par l'utilisation d'éliciteurs qui sont capables d'activer les mécanismes de défense des plantes. Le resvératrol, un polyphénol de la vigne bien connu, qui possède des activités anti-oxydantes et anti-âge de même qu'il exerce une action de protection sur la peau, constitue un exemple de ce type de métabolite. Le resvératrol et ses dérivés oligomériques

Abbreviations: CDs, cyclodextrins; DW, dry weight; FW, fresh weight; JA, jasmonic acid; MeJA, methyljasmonate; SA, salicylic acid.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail addresses: [philippe.jeandet@univ-reims.fr](mailto:philippe.jeandet@univ-reims.fr) (P. Jeandet), [christophe.clement@univ-reims.fr](mailto:christophe.clement@univ-reims.fr) (C. Clément), [leo-paul.tisserant@univ-reims.fr](mailto:leo-paul.tisserant@univ-reims.fr) (L.-P. Tisserant), [jerome.crouzet@univ-reims.fr](mailto:jerome.crouzet@univ-reims.fr) (J. Crouzet), [eric.courot@univ-reims.fr](mailto:eric.courot@univ-reims.fr) (É. Courot).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2016.02.013>

1631-0748/© 2016 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

sont déjà utilisés par plusieurs compagnies de produits cosmétiques, mais leur extraction à partir de sarments de vigne ou de sources végétales similaires demeure difficile. Les suspensions cellulaires de vigne représentent donc des systèmes intéressants pour la production en grandes quantités de ces composés. Nous présentons ici une mise au point sur leurs méthodes de bioproduction en cultures cellulaires et les résultats obtenus.

© 2016 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Polyphenol *trans*-resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a famous member of the stilbene family as this compound has been associated with the “French paradox” (Fig. 1). Its daily consumption, for example, in the form of red wine [1], has been linked to beneficial effects in humans [2] and protection against coronary heart diseases [3]. First isolated from the white hellebore (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) [4], it was then also found in Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum* syn. *Fallopia japonica*) [5], the current source for its industrial extraction in China. In grapevine leaves and berries, *trans*-resveratrol is a phytoalexin produced in response to stresses, such as wounding or pathogen attack [6] showing an antifungal activity against plant pathogens [7–11] or human pathogens [12]. In grapevine stem (wood) resveratrol is produced constitutively and acts as a phytoanticipin. In humans, resveratrol might play a role in preventing cardiovascular diseases [13]; it might also provide some protection against certain types of cancer [14], diabetes [15] and retard some neurodegenerative diseases [16]. In metazoans and mice, resveratrol has been demonstrated to extend lifespan by acting as a mimic-agent for the caloric restriction-longevity effect through sirtuin protein activation [17,18]. Nowadays, the main market for resveratrol is in the nutraceuticals

sector using the *Polygonum* root as a source but some American companies have focused on grapevine as the raw material (Longevinex®). In the cosmetics field, the grapevine seems to be the most suitable raw material for resveratrol and its derivatives for products such as face creams [19,20].

The role of resveratrol in skin protection has to be linked first to its well known antioxidant properties. For example, in a study evaluating the peroxydal scavenging activities of various wine polyphenolic monomers, resveratrol was found to be the strongest compound over catechin, epicatechin/gallocatechin and gallic acid/ellagic acid [21]. In the same way, a formulation containing 1% resveratrol (FAMAR, Athens, Greece) developed for Calidora Skin Clinics (Seattle, WA) has shown a 17-fold increase in antioxidant potency against a formulation containing 1% of the coenzyme Q analog idebenone using the ORAC test (Oxygen Radical Absorbance Capacity, Brunswick Laboratories, Norton, MA), the latter compound being recognized as the strongest topical antioxidant [22]. The resveratrol skin care formulation indeed yielded 4845  $\mu$ moles vitamin E equivalents/g against 279 for the 1% idebenone-containing formulation [23]. Another aspect of interest is the potential role of resveratrol and derivatives as whitening agents in cosmetology. Tyrosinase (monophenol, dihydroxyphenylalanine: oxygen oxidoreductase EC 1.14.18.1) is a

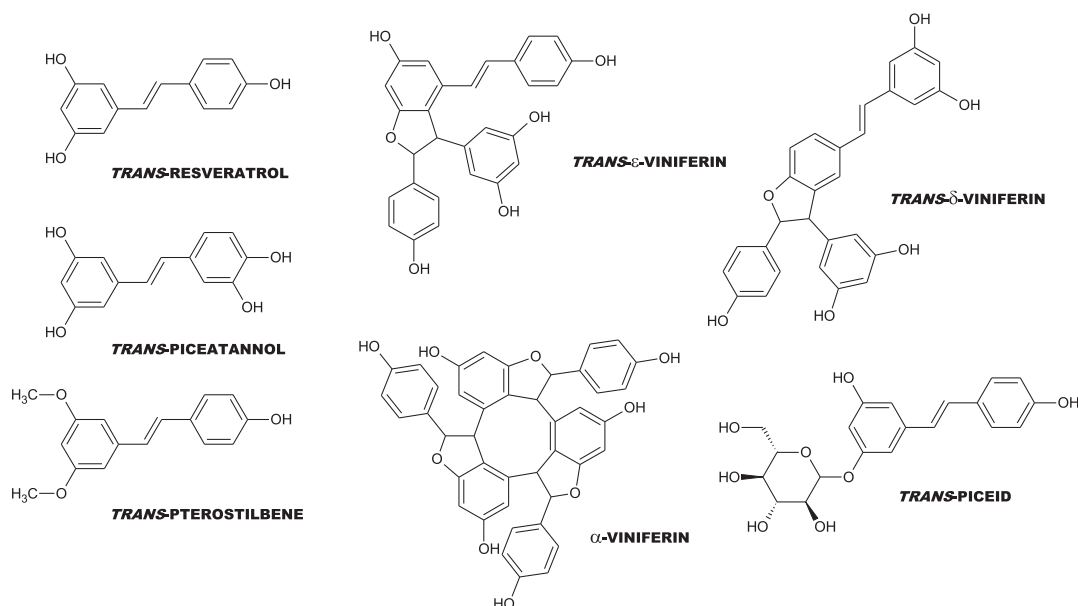


Fig. 1. Chemical structures of some hydroxystilbene monomers and dimers.

catecholase capable of oxidizing ortho-diphenolic systems, namely dihydroxyphenylalanine (DOPA), which is known as the rate-limiting enzyme of melanin anabolism in melanocytes. Melanin provides protection against UV light-induced photoaging and photocarcinogenesis. It has indeed been reported that artificially enhancing melanin biosynthesis reduced the incidence of skin cancer in mice [24] and that the frequency of malignant melanoma was lowered in dark-skinned humans [25]. However, the overproduction and uneven deposition of melanin, which results in skin spots, can be the cause of esthetic problems. This justifies the research for cosmeceuticals capable of reducing or inhibiting melanin synthesis and accumulation in humans, that is, whitening agents used to decrease hyperpigmentation [26]. Resveratrol or analogs have long been described as potent inhibitors of the tyrosinase [27]. There are some reports of resveratrol activity as an inhibitor of that enzyme using either the mushroom or the human tyrosinase as a model enzyme [26,28–30]. However, opinions differ as to its mechanism of action on tyrosinase inhibition. Some studies suggest that resveratrol itself does not function as an inhibitor of tyrosinase but is rather oxidized by it [26,28]. The oxidation forms of resveratrol in turn become true inhibitors of tyrosinase activity playing the role of “suicide substrates” for this enzyme [26,28]. Resveratrol was thus suggested to act as a kcat type inhibitor for tyrosinase [28]. In other studies, resveratrol was characterized as a direct inhibitor of the tyrosinase activity of mushroom or humans with an  $IC_{50}$  of 57.05  $\mu\text{g/L}$  on mushroom tyrosinase activity [29] and 0.39  $\mu\text{g/L}$  on human tyrosinase activity [30], respectively. Whatever its mechanism of action on tyrosinase inhibition, these results suggest a possible usage of resveratrol as a tyrosinase and melanogenesis inhibitor as well as a whitening agent. However, if the antioxidant activity of resveratrol as well as its effects on tyrosinase inhibition are well demonstrated, other ways that may explain the resveratrol action on skin protection probably exist. Altogether, these results confirm the potential of resveratrol as a cosmeceutical.

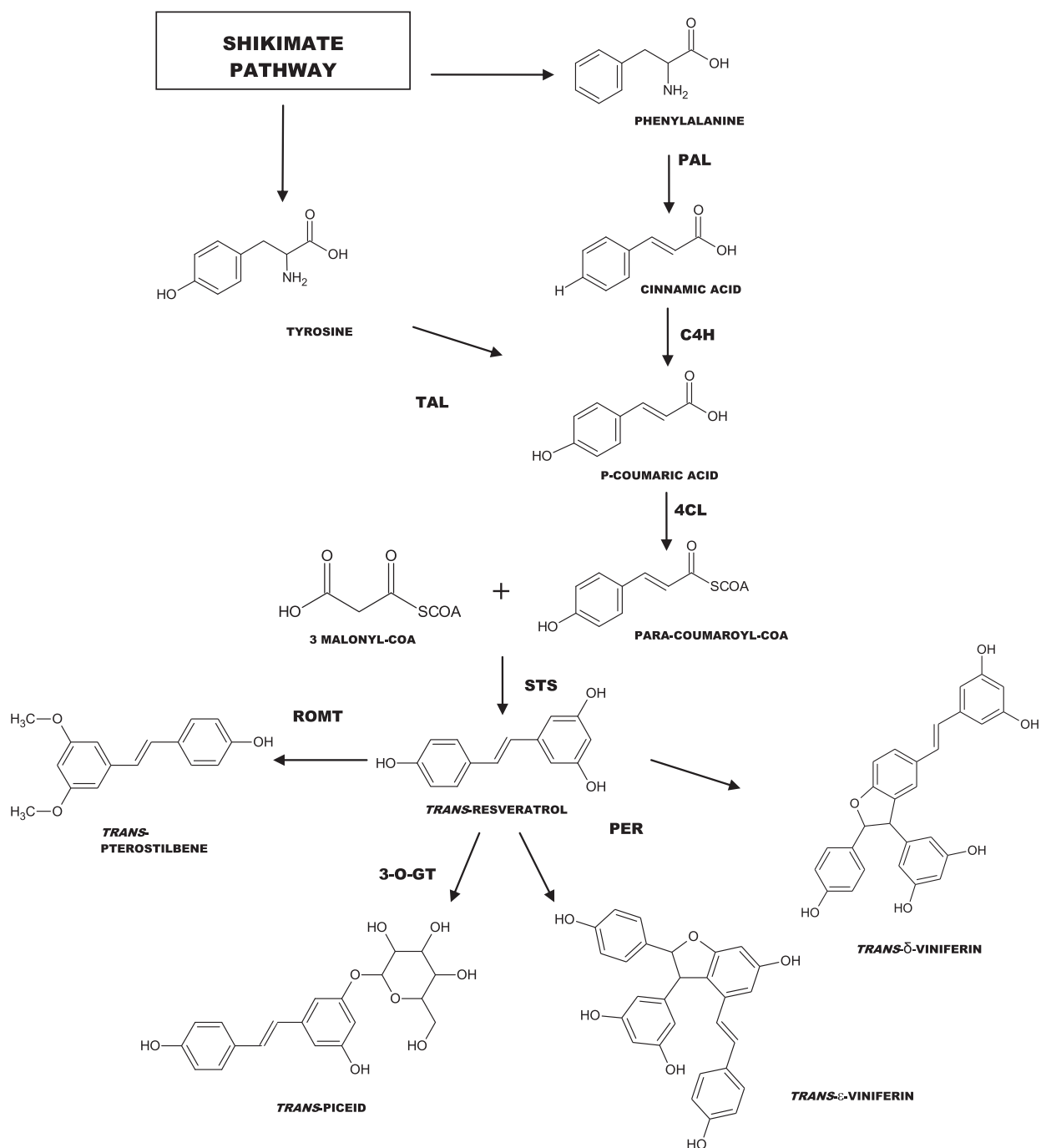
Beside resveratrol, it is now well known that grapevine is able to produce a high diversity of molecules belonging to the stilbene family (Fig. 1). All these molecules are powerful antioxidants or at least are suspected to be more active than resveratrol itself but their extraction is rather difficult, likely explaining why they are not currently sold by chemical suppliers, except the dehydrodimer (+)- $\epsilon$ -viniferin. The biosynthesis of resveratrol is quite simple, involving four steps from phenylalanine or three steps from tyrosine as starting molecules, respectively (Fig. 2). The synthesis of viniferins by peroxydases, on the other hand, remains incompletely elucidated. The production of recombinant resveratrol is now a reality and many plants, bacteria or yeast [31,32] have been modified genetically in order to produce resveratrol for the assessment of its potential role in human health promotion and plant disease control. However, there is considerable interest in searching sourcing of resveratrol without recombinant genetic modification. In this context, plant biotechnology techniques could thus represent a powerful means for large-scale production of resveratrol and its

derivatives. The use of plants also allows for low cost and rapid production of biologically active molecules in large amounts.

Since the 1980s, plant cell cultures have been used extensively to investigate the production of secondary metabolites under controlled conditions. The objective was to prevent intensive cutting and decimation of natural resources. For instance in the case of taxol, a potent anti-cancer drug isolated from *Taxus brevifolia* (Pacific yew tree), it should be noted that a sufficient dosage of this compound for one patient requires sacrificing two to four fully grown trees of this species when the bark is used for extraction. Additionally, the chemical synthesis of taxol is extremely complex (requiring 35 to 51 steps), with the highest total yield of the best synthesis of 0.4% [33 and references therein]. Plant cell cultures thus appear as a valuable alternative for the production of such a compound eliminating reliance on yew tree plantations. Moreover, plant biotechnology techniques avoid unsustainable extraction processes or chemical synthesis which include multiple steps and the use of polluting solvents and metal catalysts. The advantages afforded by *in vitro* plant cell culture systems also result from their potential low production costs (plant media only contain minerals, sugars and traces of growth regulators). In contrast, microorganisms need complex and costly fermentation media and engineering the entire metabolic pathways is needed [34]. Moreover, the axenic culture conditions afforded by plant cell systems allow one to avoid contaminants such as pesticides, fungi or heavy metals and offer the possibility for a continuous metabolite production. Although a basal production of secondary metabolites does exist in plant cell systems, elicitation has been shown as the most efficient way to induce the synthesis or to enhance the yield of various compounds of pharmaceutical interest such as alkaloids, terpenoids, phenolic compounds or heterosides [35,36]. Two plant cell model systems are currently under development through the use of undifferentiated cells (plant cell suspensions) or plant organ cultures (hairy roots obtained from *Agrobacterium rhizogenes*). Both culture systems typically take place in liquid media under aseptic conditions and are adaptable to their use in large-scale bioreactors [37]. Thereafter will be described plant cell systems usable for the production of resveratrol and related phytostilbenes.

## 2. General requirements for establishing cell suspensions for the production of phytostilbenes in shake flasks

Resveratrol and phytostilbene production has mainly been achieved using grapevine cell suspensions. To our knowledge, there is only one report of a resveratrol production by cell suspensions of other species, in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [38]. Plant cell cultures only require minerals, vitamins, sugars and minute quantities of growth regulators [39]. The media used for culturing grapevine cells are mainly the Murashige and Skoog medium [40,41–46], the Gamborg medium [47,41,48–57] and supplemented in some cases with vitamins of the Morel medium [58,41,49,51,54,56,59]. In all experiments, plant growth



**Fig. 2.** Biosynthesis of resveratrol and derivatives via the phenylalanine/polymalonate pathway. **PAL**, Phenylalanine ammonia lyase; **TAL**, Tyrosine ammonia lyase; **C4H**, Cinnamate-4-hydroxylase; **4CL**, 4-Coenzyme A ligase; **STS**, Stilbene synthase; **PER**, Peroxidases; **3-O-GT**, 3-Glucosyl-O-transferase; **ROMT**, Resveratrol-O-methyl transferase.

regulator combinations including auxins + cytokinins were used. Plant cell suspensions are rotary shaken (100–110 rpm) and maintained in total darkness [46,50,52–57,59], with a 16 h light/8 h dark and 14 h light/10 h dark cycle [44,48,49,51] or under continuous fluorescent light [41–43,45]. When discontinuous or continuous

illumination is used, light can induce the biosynthesis of pigments such as anthocyanins, or the photoisomerization of *trans*-resveratrol to the *cis*-form, all by-products that will have to be removed during the purification process. Sucrose is generally added as the carbon source at a concentration of 10 g/L [44], 20 g/L [48,49,51,52,54–56], 30 g/L [46,53,57] or

even 60 g/L [41,42]. In the latter case, such a high sucrose concentration has been suggested to constitute an osmotic stress capable of inducing the production of secondary metabolites [36].

### 3. Use of elicitors for the induction of resveratrol production in shake flasks

Resveratrol production by grapevine cell systems has mainly been achieved in Erlenmeyer flasks of 250 mL and in some cases in small working volumes of 20 mL with or without elicitors and cell suspensions are also able to synthesize resveratrol and its glucoside constitutively [38,41,43,60]. Nonetheless, most described experiments employed biotic agents, the so-called elicitors [61], for inducing phytoestilbene biosynthesis in plant cell suspensions. Some of the used elicitors are signal molecules involved in many plant cell signaling pathways [61]. For instance, jasmonic acid (JA) which is implied in transduction cascades and its derivative, methyljasmonate (MeJA) have been used as inducers of hydroxystilbene production in various plant cell culture systems [42,44–46,51,52,54,55,62–66]. MeJA is indeed known to trigger overproduction of compounds of medical interest in cell suspensions: the anti-cancer drugs, taxol (paclitaxel) in *T. brevifolia* Pacific yew tree [64] and ginsenosides in *Panax ginseng* [65] or the synthesis of rosmarinic acid, a caffeic acid ester with potent applications for Alzheimer's disease in *Coleus blumei* cultures [66]. Unexpectedly, MeJA alone was found to be a low elicitor of phytoestilbene production in grapevine cell suspensions. Moreover, it was also reported to decrease cell growth, this decrease being associated with a 20–60% lower biomass generation rate despite any effect on cell viability [46,50,54]. MeJA is generally added at doses ranging from 5 to 100  $\mu$ M to grapevine (*Vitis vinifera*) cell suspensions resulting in low to moderate synthesis of resveratrol or its glucoside, piceid, in shake flasks (Table 1). For instance, 10–20  $\mu$ M MeJA promoted the endogenous production of 24  $\mu$ g/g FW resveratrol [44] and 120  $\mu$ g/g FW piceid [45] in grapevine cell suspensions. The best eliciting experiments with MeJA were obtained in cell suspensions of *V. vinifera* cv Monastrell with a resveratrol production of 3.74 mg/g DW using 100  $\mu$ M MeJA [54] and in those of the cultivar Gamay Fréaux var Teinturier with a piceid production of 840 mg/L using 10  $\mu$ M MeJA [42].

Other signaling molecules such as salicylic acid (SA) and ethylene are also capable of inducing phytoestilbene biosynthesis in grapevine cell suspensions. A hyper-elicitation of resveratrol production in the order of 2.7 g/L was obtained upon the addition of 10  $\mu$ M JA and 500  $\mu$ M SA together with a non aromatic resin dedicated to suppress the toxic effects of SA and JA in *V. vinifera* cv Gamay Fréaux var Teinturier cells [53]. A high resveratrol production of 2.4 g/L has also been reported in cell suspensions of the same cultivar combining treatment with a  $\beta$ -glucan, an Amberlite resin and 10  $\mu$ M JA [67]. Finally, 1 mM ethylene combined with 50 mM cyclodextrins (see below) and 100  $\mu$ M MeJA was shown to induce more than 1.5 g/L resveratrol in *V. vinifera* cv Monastrell cell suspensions [68].

Resveratrol and its derivatives are not readily soluble in aqueous solutions as well as in cell suspensions. Moreover, phytoestilbenes are subjected to oxidation and aggregation phenomena. In order to increase the solubility of these compounds and diminish subsequent degradation of the synthesized stilbenes, a number of studies have reported the use of cyclodextrins (CDs) in cell suspension systems [48–51,54,69,70]. CDs act as chelating agents, constituting a family of cyclic oligosaccharides composed of  $\alpha$ -(1,4) linked glucopyranose units [71]. CDs possess a cage-like supramolecular structure comprising a central hydrophobic cavity while the rims of the surrounding walls are hydrophilic (Fig. 3). Such a particular molecular architecture allows the formation of complexes with hydroxystilbenes increasing the solubility of the latter in cell suspensions and protecting them from oxidative degradation and aggregation phenomena [72]. Beside their role as drug carriers, CDs are also potent elicitors of resveratrol biosynthesis in grapevine suspensions alone or in combination with MeJA [48–51,54,68–70,73]. Various methylated  $\beta$ -cyclodextrins with methylation degrees ranging from 11 to 14 and used at 50 mM in grapevine cell suspensions were able to induce high resveratrol levels from 3 g to 5 g/L [69] (Table 1). The influence of the genotype on the response to elicitation with CDs was directly evidenced in the work of Zamboni et al. [70], the non-*vinifera* genotypes producing 60–1800 times more phytoestilbenes than *vinifera* genotypes. CDs tested as elicitors of hydroxystilbene biosynthesis against MeJA, JA or SA generally showed the strongest activity (Table 1). Moreover, in contrast to MeJA, they did not affect cell viability or cell growth [48–50]. CDs possess structural motifs which resemble the alkyl-derivatized oligosaccharides produced during pectin hydrolysis by fungal pathogens [49], thus explaining their eliciting activity on phytoestilbene biosynthesis in plant cell suspension systems.

The best eliciting conditions for the production of phytoestilbenes by cell suspensions consist of the use of methylated CDs in combination with MeJA. Some studies have indeed reported the synergistic effect of MeJA and CDs in their ability to induce namely the biosynthesis of taxol and related taxanes in cell cultures of *Taxus* species [74] as well as the resveratrol bioproduction in grapevine cell suspensions [50,51,54]. Though a weak to moderate extracellular accumulation of this compound was observed in *V. vinifera* cell suspensions of the cv Gamay as a response to 100  $\mu$ M MeJA or 50 mM of a methylated CD, respectively 20 mg/L and 900 mg/L, a high resveratrol production (3.1 g/L) was obtained with those two elicitors used in combination [51]. In the same way, 50 mM DIMEB ((heptakis [2,6-di-O-methyl]- $\beta$ -cyclodextrin) in combination with 100  $\mu$ M MeJA induced a 5-fold increase in the resveratrol biosynthesis by grapevine cell suspensions of the cv Monastrell albino (365 mg/g DW) as compared to the obtained 68 mg/g DW in response to the cyclodextrin alone [50]. Recently, coronatine, a phytotoxin from *Pseudomonas syringae* acting as a mimic molecule of the isoleucine conjugated form of JA [75] and known for its ability to induce phytoalexin biosynthesis in rice [76], was shown to stimulate at a concentration of 1  $\mu$ M in combination with 50 mM CDs, a production of around 0.94 g/L resveratrol in cv Monastrell

**Table 1**  
Plant cell systems in shake flasks for the bioproduction of phyto stilbenes.

Plant	Elicitors	Produced stilbenes	References
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Fréaux var. Teinturier	None	150 mg/L stilbene glucosides	[41]
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Fréaux var. Teinturier	None	40 mg/L piceids	[60]
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Fréaux var. Teinturier	None	330 mg/L stilbenes	[43]
<i>Gossypium hirsutum</i>	None	7.2 µg/g DW <i>t</i> -resveratrol	[38]
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Fréaux var. Teinturier	MeJA 25 µM	200 mg/L piceids	[62]
<i>Vitis vinifera</i> cv Cabernet Sauvignon	MeJA 25 µM	300 mg/L piceids	[42]
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Fréaux var. Teinturier	MeJA 10 µM	840 mg/L piceids	
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Fréaux var. Teinturier	MeJA (20 µM)	12 µg/g FW resveratrol and piceids extracellular	[45]
		120 µg/g FW resveratrol and piceids Intracellular	
	MeJA 20 µM + 20 g/L sucrose	46 µg/g FW resveratrol and piceids extracellular	[45]
		103 µg/g FW resveratrol and piceids Intracellular	
<i>Vitis vinifera</i> cv Barbera	MeJA 10 µM	23.94 µg/g DW resveratrol intracellular	[44]
		7.98 µg/g DW resveratrol extracellular	
Roostock 41 B	MeJA 200 µM	150 mg/L resveratrol	[46]
<i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell	MeJA 5 µM	798 µg/g DW resveratrol	[54]
	MeJA 100 µM	3.74 mg/g DW resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Alphonse Lavallée	MeJA 25 µM + low energy ultrasounds	Viniferins	[55]
<i>Vitis vinifera</i> cv Cabernet Sauvignon	MeJA 100 µM + UV-C	2 mg/g DW resveratrol intracellular	[63]
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay	MeJA 100 µM	20 mg/L resveratrol	[51]
<i>Vitis vinifera</i> cv Italia	MeJA 25 µM	0.970 mg/g DW stilbenes	[52]
	JA 25 µM	1.023 mg/g DW stilbenes	
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Fréaux var. Teinturier	MeJA 10 µM + SA 500 mM + resin H2MGL	2667 mg/L resveratrol	[53]
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Fréaux var. Teinturier	JA 10 µM + β-glucan + Amberlite resin	2400 mg/L resveratrol	[67]
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay	DIMEB 5 mM	148–184 mg/L <i>t</i> -resveratrol	[48]
<i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell	DIMEB 50 mM	>4000 mg/L resveratrol	[69]
	HYPROB <sup>a</sup> 50 mM	5000 mg/L resveratrol	
	CAVASOL <sup>b</sup> 50 mM	5000 mg/L resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell albino	DIMEB 50 mM	3400 mg/L resveratrol	[49]
	HYPROB 50 mM	3000 mg/L resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay Rouge	DIMEB 50 mM	3000 mg/L resveratrol	[49]
	HYPROB <sup>a</sup> 50 mM	990 mg/L resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay	Methylated CDs 50 mM	900 mg/L resveratrol	[51]
<i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell	Undefined CDs 50 mM	600 mg/L resveratrol	[54]
<i>V. riparia</i> × <i>V. berlandieri</i>	DIMEB 50 mM	911 mg/L resveratrol	[70]
<i>V. amurensis</i>	DIMEB 50 mM	225 mg/L resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Merzling	DIMEB 50 mM	4 mg/L resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Pinot noir	DIMEB 50 mM	0.5 mg/L resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell albino	DIMEB 50 mM + MeJA 100 µM	365 mg/g DW resveratrol	[50]
	DIMEB 50 mM alone	60 mg/g DW resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Gamay	Methylated CDs 50 mM + MeJA 100 µM	3100 mg/L resveratrol	[51]
<i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell	Undefined CDs 50 mM + MeJA 100 µM	3000 mg/L resveratrol	[54]
<i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell	CAVASOL <sup>b</sup> 50 mM + ethylene 1 mM	680 mg/L resveratrol	[68]
	CAVASOL <sup>b</sup> 50 mM + SA 100 µM	260 mg/L resveratrol	
	CAVASOL <sup>b</sup> 50 mM + MeJA 100 µM + ethylene 1 mM	1540 mg/L resveratrol	
	CAVASOL <sup>b</sup> 50 mM + MeJA 100 µM + SA 100 µM	1040 mg/L resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Monastrell	CD 50 mM + 1 µM coronatine	943 mg/L resveratrol	[59]
	CD 50 mM + MeJA	1600 mg/L resveratrol	
<i>Vitis vinifera</i> cv Negroamo	Coronatine 10 µM	35 mg/L resveratrol	[57]
		210 mg viniferins/L	
<i>Arachis hypogaea</i> <b>Hairy roots</b>	Sodium acetate 10.2 mM	300–588 µg/g DW of root Resveratrol extracellular	[80]
<i>Vitis rotundifolia</i> <b>Hairy roots</b>	MeJA 100 µM	<23 µg/g DW Resveratrol extracellular 1.81 µg/g DW ε-viniferin extracellular 182 µg/g DW Piceids intracellular	[81]

<sup>a</sup> Cyclodextrin.

<sup>b</sup> Cyclodextrin.



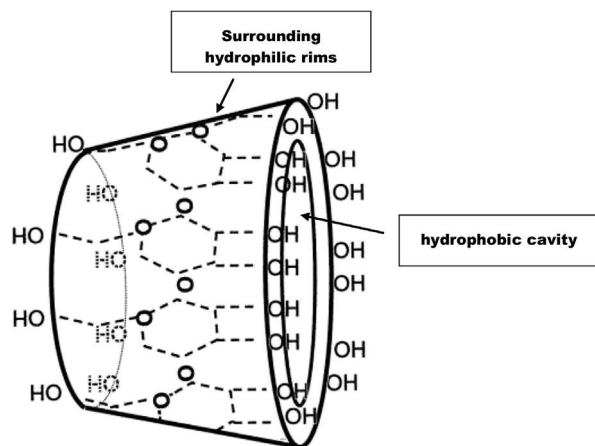


Fig. 3. Schematic representation of a cyclodextrin.

grapevine cultures [59]. However, this resveratrol production was lower than that induced by the combination of methyljasmonate and a cyclodextrin (1.6 g/L). Ten fold-higher concentrations of coronatine (10  $\mu$ M) induced similar effects on resveratrol biosynthesis in cv Negramaro grapevine cells and importantly the production of intracellular viniferins [57].

#### 4. Transfer from shake flasks to bioreactors

Transfer of the production of resveratrol by the means of biotechnological methods from the laboratory to the industrial scale relies on the use of cell suspensions in bioreactors. Typically the capacity of the bioreactors ranges from 1 L to over 75,000 L as those used for the large-scale production of the anti-cancer drug, paclitaxel (taxol) by Phyton Biotech ([www.phytonbiotech.com](http://www.phytonbiotech.com)). Although most experiments describing resveratrol or phytostilbene synthesis in grapevine cell cultures take place in shake flasks of 20–250 mL with 10–100 mL volumes of cell suspensions [41–46,48–55,60,62,63,68–70], there are only few reports of production of those compounds in bioreactors [43,46,60,77]. The main apparatus employed include classical configurations such as stirring tanks [43,46,60,77] and V-shaped or cylindrical bubble columns [78,79]. Besides the question of the bioreactor design, the transfer

from flasks to bioreactors requires the optimization of a lot of parameters such as 1) the sucrose concentration which typically ranges from 20 to 60 g/L [41,42,44,46,48,49,51–57], 2) the speed of agitation in the case of stirred tanks, 50 rpm [46], 75 rpm [77] and 100 rpm [60], 3) the density inoculums, and 4) the aeration rates fixed at 0.075 to 2 vvm [43,78,79]. In our own experiments, we observed that grapevine cells from the roostock 41 B (*V. vinifera* cv Chasselas  $\times$  *V. berlandieri*) only tolerated low aeration and agitation rates, respectively, 0.025 vvm and 50 rpm [46]. This latter remark underlines the fact that transferring plant cell suspensions from shake flasks to bioreactors raises several issues which depend on the cultivated species or even on the used cell line. Although a constitutive production of the resveratrol glucoside piceid was already reported in bioreactors with Gamay Fréaux cell suspensions [60] (Table 2), the other experiments were conducted using elicitors or signaling molecules, mainly, MeJA and CDs alone or in combination. The maximal stilbene production utilizing the combination CDs + MeJA expressed as the resveratrol production in mg/g FW multiplied by the maximal biomass in grams obtained in a given system can reach the high value of 7.03 g/L resveratrol in cell suspensions of the variety Gamay in a stirred tank [78], 3.3 g/L in a V-shaped bubble column [78] and 6 g/L in a bubble column cylindrical with a three cycle-one stage culture system [79]. Here again a synergistic eliciting effect between CDs and MeJA was observed as the combination of these two elicitors resulted in a 4–6-fold increase in the resveratrol production (Table 2). The quantities of resveratrol recovered in bioreactors are thus in the same order, a few grams per liter, as those obtained in shake flasks using the best eliciting combinations (CDs + MeJA). Chitosan, which is a  $\beta$ -1,4-linked *N*-glucosamine polymer of the cell wall of numerous phytopathogenic fungi, was also found to induce the bioproduction though low of phytostilbenes, reaching 48 mg/L, in liquid cultures of *V. vinifera* cv Barbera petiole cells in a 1L-bioreactor at a concentration of 50 mg/L [77].

#### 5. Resveratrol production in hairy roots

Hairy root cultures have also been used for stilbene production. This valuable system for the production of plant secondary metabolites [36] is obtained through the

Table 2  
Resveratrol production in bioreactors.

Type of bioreactor	Working volume (L)/Grapevine cv	Aeration rate (vvm)	Maximal Biomass (g FW/L)	Produced stilbenes/Elicitor	References
Stirred bioreactor	15/Gamay Fréaux	0.2	269	30 mg/L piceids <sup>a</sup> None	[60]
Stirred bioreactor	2/Roostock 41 B	0.025	546	209 mg/L resveratrol/Meja	[46]
Stirred bioreactor	Not given/Gamay Fréaux	0.075–0.15	518	280 mg/L stilbene monomers <sup>a</sup> /None	[43]
Stirred bioreactor	0.8/Barbera	0.2 L O <sub>2</sub> /min	40	48 mg/L resveratrol, piceid resveratrolside <sup>a</sup> /Chitosan	[77]
Bubble column V-shaped	1.1/Gamay	0.95	246	3.3 g/L resveratrol <sup>a</sup> /CDs + MeJA 0.5 g/L resveratrol <sup>a</sup> /CDs	[78]
Stirred bioreactor	1.1/Gamay	2	521	7 g/L resveratrol <sup>a</sup> /MeJA + CDs 1.6 g/L resveratrol <sup>a</sup> /CDs	[78]
Bubble column cylindrical	5.8 L $\times$ 3/Gamay	0.47–0.54	183	6 g/L resveratrol <sup>a</sup> /MeJA + CDs	[79]

<sup>a</sup> Maximal biomass (g FW/L)  $\times$  Stilbene production (mg/g FW).

transformation of plant tissues by transferring the bacterial plasmid Ri T-DNA from *A. rhizogenes*, which causes a genetic modification leading to the development of roots. These roots are able to grow in liquid media and produce secondary metabolites. For the production of resveratrol, hairy root cultures of peanut (*Arachis hypogea*) were elicited with sodium acetate (10.2 mM) leading to a low production of extracellular resveratrol (300–588 µg/g DW of root) (Table 1) [80]. Recently, hairy roots of Muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) were obtained in which an extracellular production of resveratrol (<23 µg/g DW; <100 nmol/g DW) and ε-viniferin (1.81 µg/g DW; <4 nmol/g DW) as well as an intracellular production of piceids of 182 µg/g DW (467 nmol/g DW) following elicitation by 100 µM MeJA [81] were characterized.

## 6. Conclusion

Resveratrol is a secondary metabolite which could be of great interest in the field of cosmetology given its antioxidant and anti-aging properties as well as its action on skin as a whitening agent. There is thus the need for resveratrol production methods using sustainable sourcing and without the use of genetically-modified organisms. Grapevine cell suspensions have been reported to produce resveratrol and derivatives, mainly its glucoside piceid and one of its dimeric compound, ε-viniferin. Most resveratrol production assays have been conducted in shake flasks and resveratrol was synthesized constitutively or as a response to elicitor treatments. Impressive levels of 3–5 g resveratrol per liter have been observed in shake flasks upon treatment with methyljasmonate/cyclodextrins in combination or cyclodextrins alone. One question still remains on how the transfer from shake flasks to bioreactors can be achieved. There are only few experiments reporting the transfer of the resveratrol production from small working volumes (10–100 mL of plant suspensions) to bioreactors (1–15 L of plant suspensions). However some results have suggested that resveratrol production in bioreactors is feasible with very good yields up to 7 g/L. In most experiments, resveratrol was described as being mainly excreted in the extracellular medium, meaning that its purification can be easily performed using apolar solvents such as ethyl acetate. Piceid remains within the cells and its extraction will need a greater number of steps. Elucidation of the resveratrol excretion-mechanisms through the plant cell wall, which are still not very well known, might thus be of help in further enhancing its production/secretion in the culture medium.

## References

- [1] P. Jeandet, R. Bessis, B.F. Maume, P. Meunier, D. Peyron, P. Trollat, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 316.
- [2] J. Wang, L. Ho, Z. Zhao, I. Seror, N. Humala, D.L. Dickstein, M. Thiyagarajan, S.S. Percival, S.T. Talcott, G.M. Pasinetti, *FASEB J.* 20 (2006) 2313.
- [3] M. Gronbaek, U. Becker, D. Johansen, A. Gottschau, P. Schnohr, H.O. Hein, G. Jensen, T.I.A. Sørensen, *Ann. Intern. Med.* 133 (2000) 411.
- [4] M.J. Takaoka, *J. Fac. Sci. Hokkaido Imperial Univ.* 3 (1940) 1.
- [5] S. Nonomura, H. Kanagawa, A. Makimoto, *Yakugaku Zasshi* 83 (1963) 988.
- [6] P. Langcake, R.J. Pryce, *Physiol. Plant Pathol.* 9 (1976) 77.
- [7] M. Adrian, P. Jeandet, J. Veneau, L.A. Weston, R. Bessis, *J. Chem. Ecol.* 23 (1997) 1689.
- [8] P. Jeandet, A.-C. Douillet-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi, M. Adrian, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2731.
- [9] P. Jeandet, A. Conreux, B. Delaunois, D. Donnez, V. Nuzzo, S. Cordelier, C. Clément, E. Courrot, *Biofactories* 36 (2010) 331.
- [10] M. Adrian, P. Jeandet, *Fitoterapia* 83 (2012) 1345.
- [11] P. Jeandet, C. Hébrard, M.-A. Deville, S. Cordelier, S. Dorey, A. Aziz, J. Crouzet, *Molecules* 19 (2014) 18033.
- [12] B. Houillé, N. Papon, L. Boudesocque, E. Bourdeaud, S. Besseau, V. Courdavault, E. Enguehard-Gueiffier, G. Delanoue, L. Guérin, J.P. Bouchara, M. Clastre, N. Giglioli-Guivarc'h, J. Guillard, A. Lanoue, *J. Nat. Prod.* 77 (2014) 1658.
- [13] S. Bradamante, L. Barenghi, A. Villa, *Cardiovasc. Drug Rev.* 22 (2004) 169.
- [14] J.K. Kundu, Y. Surh, *Cancer Lett.* 269 (2008) 243.
- [15] S. Sharma, K. Chopra, S.K. Kulkarni, *Phytother. Res.* 21 (2007) 278.
- [16] T.S. Anekonda, *Brain Res. Rev.* 52 (2006) 316.
- [17] J.G. Wood, B. Regina, S. Lavu, K. Hewitz, S.L. Helfand, M. Tatar, D.A. Sinclair, *Nature* 430 (2004) 686.
- [18] J.L. Barger, T. Kayo, J.M. Vann, E.B. Arias, J. Wang, T.A. Hacker, Y. Wang, D. Raederstorff, J.D. Morrow, C. Leeuwenburgh, D.B. Allison, K.W. Saupé, G.D. Cartee, R. Weindruch, T. Prolla, *PLoS One* 3 (2008) 2264.
- [19] J. Vercauteren, C. Castagnino, J.C. Delaunay, *US Patent* 6,572,882 B1, 2003.
- [20] P. André P., I. Renimel, *US Patent* 7,718,203 B2, 2010.
- [21] Y. Yilmaz, R.T. Toledo, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 255.
- [22] D.H. McDaniel, B.A. Neudecker, J.C. Dinardo, J.A. Lewis, H.I. Malbach, *J. Cosmet. Dermatol.* 4 (2005) 10.
- [23] R.A. Baxter, *J. Cosmet. Dermatol.* 7 (2008) 2.
- [24] J.A. d'Orazio, T. Nobuhisa, R. Cui, M. Arya, M. Spry, K. Wakamatsu, V. Igras, T. Kunisada, S.R. Granter, E.K. Nishimura, S. Ito, D. Fisher, *Nature* 443 (2006) 340.
- [25] Y. Yamaguchi, J.Z. Beer, V.J. Hearing, *Arch. Dermatol. Res.* 300 (2008) S43.
- [26] P. Bernard, J.-Y. Berthon, *Int. J. Cosmet. Sci.* 22 (2000) 219.
- [27] N.H. Shin, S.Y. Ryu, E.J. Choi, S.H. Kang, I.M. Chang, K.R. Min, Y. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 (1998) 801.
- [28] H. Satooka, J. Kubo, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 1090.
- [29] D.C. Franco, G.S. de Carvalho, P.R. Rocha, R. da Silva Teixeira, A.D. da Silva, N.R. Raposo, *Molecules* 17 (2012) 11816.
- [30] J. Park, Y.C. Boo, *Evid Based Compl. Alt. Med.* 2013 (2013). ID 645257.
- [31] B. Delaunois, S. Cordelier, A. Conreux, C. Clément, P. Jeandet, *Plant Biotechnol. J.* 7 (2009) 2.
- [32] P. Jeandet, B. Delaunois, A. Aziz, D. Donnez, Y. Vasserot, S. Cordelier, E. Courrot, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012). ID 579089.
- [33] P.K. Ajikumar, W.H. Xiao, K.E.J. Tyo, Y. Wang, F. Simeon, E. Leonard, O. Mucha, T.H. Phon, B. Pfeifer, G. Stephanopoulos, *Science* 330 (2010) 70.
- [34] P. Jeandet, Y. Vasserot, T. Chastang, E. Courrot, *BioMed. Res. Int.* 2013 (2013). ID 780145.
- [35] A.G. Namdeo, *Plant Pharmacogn. Rev.* 1 (2007) 69.
- [36] R. Ramachandra, G.A. Ravishankar, *Biotechnol. Adv.* 20 (2002) 101.
- [37] K.M. Oksman-Caldentey, D. Inzé, *Trends Plant Sci.* 9 (2004) 433.
- [38] T.H. Kouakou, P. Waffo Teguo, J. Valls, J. Kouadio, A. Descendit, J.-M. Mérillon, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 86 (2006) 405.
- [39] D. Donnez, P. Jeandet, C. Clément, E. Courrot, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 706.
- [40] T. Murashige, F. Skoog, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473.
- [41] P. Waffo-Teguo, A. Descendit, S. Krisa, G. Deffieux, J. Vercauteren, J.-M. Mérillon, *J. Nat. Prod.* 59 (1996) 1189.
- [42] X. Vitrac, S. Krisa, A. Descendit, J. Vercauteren, A. Nürich, J.-P. Monti, G. Deffieux, J.-M. Mérillon, *J. Biotechnol.* 95 (2002) 49.
- [43] V. Aumont, F. Larronde, T. Richard, H. Budzinski, A. Descendit, G. Deffieux, S. Krisa, J.-M. Mérillon, *J. Biotechnol.* 109 (2004) 287.
- [44] A. Tassoni, S. Fornalè, M. Franceschetti, F. Musiani, A.J. Michael, B. Perry, N. Bagni, *New Phytol.* 166 (2005) 895.
- [45] A. Belhadj, N. Telef, C. Saigne, S. Cluzet, F. Barrieu, S. Hamdi, J.-M. Mérillon, *Plant Physiol. Biochem.* 46 (2008) 493.
- [46] D. Donnez, K.H. Kim, S. Antoine, A. Conreux, V. De Luca, P. Jeandet, C. Clément, E. Courrot, *Process. Biochem.* 46 (2011) 1056.
- [47] O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima, *Exp. Cell Res.* 50 (1968) 151.
- [48] M. Morales, R. Bru, F. Garcia-Carmona, A. Ros Barcelo, M.A. Pedreno, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 53 (1998) 179.
- [49] R. Bru, S. Sellés, J. Casado-Vela, S. Belchi-Navarro, M.A. Pedreno, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 65.

- [50] D. Lijavetzky, L. Almagro, S. Belchi-Navarro, J.M. Martinez-Zapater, R. Bru, M.A. Pedreno, *BMC Res. Notes* 1 (2008) 132.
- [51] M.J. Martinez-Esteso, S. Sellés-Marchart, J.C. Vera-Urbina, M.A. Pedreno, R. Bru-Martinez, *J. Proteom.* 73 (2009) 331.
- [52] A.R. Santamaria, N. Mulinacci, A. Valetta, M. Innocenti, G. Pasqua, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 9094.
- [53] X. Yue, W. Zhang, M. Deng, *Biochem. Eng. J.* 53 (2011) 292.
- [54] S. Belchi-Navarro, L. Almagro, D. Lijavetzky, R. Bru, M.A. Pedreno, *Plant Cell Rep.* 31 (2012) 81.
- [55] A.R. Santamaria, M. Innocenti, N. Mulinacci, F. Melani, A. Valletta, I. Sciandra, G. Pasqua, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 11135.
- [56] S. Belchi-Navarro, L. Almagro, A.B. Sabater-Jara, F. Fernandez-Perez, R. Bru, M.A. Pedreno, *Plant Physiol. Biochem.* 62 (2013) 107.
- [57] M. Taurino, I. Ingrosso, L. d'Amico, S. de Domenico, I. Nicoletti, D. Corradini, A. Santino, G. Giovino, *SpringerPlus* 4 (2015) 49.
- [58] G. Morel, *Ann. Physiol. Vég.* 8 (1970) 189.
- [59] L. Almagro, S. Belchi-Navarro, A. Martinez-Marquez, R. Bru, M.A. Pedreno, *Plant Physiol. Biochem.* 97 (2015) 361.
- [60] A. Descendit, K.G. Ramawat, P. Waffo, G. Deffieux, A. Badoc, J.-M. Mérillon, *Biotechnol. Lett.* 18 (1996) 659.
- [61] N. Benhamou, *Trends Plant Sci.* 1 (1996) 223.
- [62] S. Krisa, F. Larroude, H. Budzinski, A. Descendit, G. Deffieux, J.-M. Mérillon, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 1688.
- [63] A. Xu, J.-C. Zhan, W.-D. Huang, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 122 (2015) 197.
- [64] Y. Yukimune, H. Tabata, Y. Higashi, Y. Hara, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 1129.
- [65] E. Szabo, A. Thelen, M. Petersen, *Plant Cell Rep.* 18 (1999) 485.
- [66] K.W. Yu, W. Gao, E.J. Hahn, K.Y. Pack, *Biochem. Eng. J.* 11 (2002) 211.
- [67] T.V. Vuong, C. Franco, W.Z. Zhang, *Biotechnol. Rep.* 1-2 (2014) 15.
- [68] S. Belchi-Navarro, L. Almagro, A.B. Sabater-Jara, F. Fernandez-Perez, R. Bru, M.A. Pedreno, *J. Plant Physiol.* 170 (2013) 258.
- [69] R. Bru-Martinez, M. Pedreno-Garcia, *US Patent* 2006/0205049 A1, 2006.
- [70] A. Zamboni, U. Vrhovsek, H.H. Kassemeyer, F. Mattivi, R. Velasco, *Vitis* 45 (2006) 63.
- [71] E. Martin del Valle, *Process. Biochem.* 39 (2004) 1033.
- [72] C. Lucas-Abellan, I. Fortea, J.M. Lopez-Nicolas, E. Nunez-Delgado, *Food Chem.* 104 (2007) 39.
- [73] A. Zamboni, P. Gatto, A. Cestaro, S. Pilati, R. Viola, F. Mattivi, C. Moser, R. Velasco, *BMC Genom.* 10 (2009) 363.
- [74] A.B. Sabater-Jara, M. Onrubia, E. Moyano, M. Bonfill, J. Palazon, M.A. Pedreno, R.M. Cusido, *Plant Biotechnol. J.* 12 (2014) 1075.
- [75] L. Katsir, A.L. Schillmiller, P.E. Staswick, S.Y. He, G.A. Howe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 7100.
- [76] S. Tamogami, O. Kodama, *Phytochemistry* 54 (2000) 689.
- [77] M. Ferri, S.C.F. Dipalo, N. Bagni, A. Tassoni, *Food Chem.* 124 (2011) 1473.
- [78] J.C. Vera-Urbina, S. Selles-Marchart, M.J. Martinez-Esteso, M.A. Pedreno, R. Bru-Martinez, in: D. Delmas (Ed.), *Resveratrol: Source, Production, and Health Benefits*, 19, Nova Science Publishers, Inc, New York, 2013.
- [79] L. Almagro, S. Belchi-Navarro, A.B. Sabater-Jara, J.C. Vera-Urbina, S. Selles-Marchart, R. Bru, M.A. Pedreno, in: K.G. Ramawat, J.-M. Mérillon (Eds.), *Handbook of Natural Products*, 1683, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
- [80] F. Medina-Bolivar, J. Condori, A.M. Rimando, J. Hubstenberger, K. Shelton, S.F. O'Keefe, S. Bennett, M.C. Dolan, *Phytochemistry* 68 (2007) 1992.
- [81] C. Nopo-Olazabal, J. Hubstenberger, L. Nopo-Olazabal, F. Medina-Bolivar, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 11744.

## **5<sup>ème</sup> Article : nouveau procédé d'extraction du *t*-resvérol**

---





## Development of a liquid-liquid extraction method of resveratrol from cell culture media using solubility parameters



Mohamad Houssam Al balkhi<sup>a,b</sup>, Mohammad Amin Mohammad<sup>b,c</sup>, Léo-Paul Tisserant<sup>a,d</sup>, Michèle Boitel-Conti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Biologie des Plantes et Innovation EA 3900, UFR des sciences, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France*

<sup>b</sup> *Faculty of Pharmacy, University of Damascus, Damascus, Syria*

<sup>c</sup> *School of Pharmacy, University of Bradford, Bradford BD7 1DP, UK*

<sup>d</sup> *Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne EA 4707, UFR Sciences Exactes et Naturelles, SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 14 December 2015

Received in revised form 17 June 2016

Accepted 22 June 2016

Available online 23 June 2016

#### Keywords:

Benzyl benzoate  
Liquid-liquid extraction  
Partition coefficient  
Plant cell culture  
Resveratrol  
Solubility parameters  
Solvent consumption

### ABSTRACT

The extraction of bioactive compounds, produced by plant cell cultures, directly from their culture medium, which contains other by-products, is a great challenge. Resveratrol extraction from its grapevine cell cultures is considered here as an example to improve the extraction processes from plant cell cultures using solubility parameters. Successive liquid-liquid extraction (LLE) processes were exploited to extract resveratrol from the culture medium with an extraction ratio approaching 100%, high selectivity and minimum amounts of solvents. The calculations of partition coefficients as a function of solubility parameters demonstrated that benzyl benzoate is the most suitable intermediate solvent to extract resveratrol from its aqueous medium. The calculations also illustrated the high ability of methanol and ethanol to extract resveratrol from benzyl benzoate. The physicochemical properties of benzyl benzoate and processing conditions were exploited to separate it from aqueous media and organic solvents. The agitation method, component ratios and extraction time were studied to maximize the extraction yield. Under the best studied conditions, the recovery of resveratrol from different culture media approached ~100% with a selectivity of ~92%. Ultimately, the improved extraction processes of resveratrol are markedly efficient, selective, rapid and economical.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Stilbenes are polyphenols identified in 33 taxonomically unrelated plant families and 72 plant species including grapevine (*Vitis vinifera*), peanut (*Arachis hypogaea*) and Japanese knotweed (*Polygonum cuspidatum*) [1–3]. Resveratrol is the major and most studied stilbene, and presents in a monomeric form as either the *trans*- or *cis*-isomer. *Trans*-resveratrol is the most bioactive form and has many pharmacological properties [4]. Cellular suspensions and hairy roots are plant cell culture systems used as bio-factories to produce bioactive compounds like resveratrol [5,6]. The efficient and economical separation of resveratrol from the culture medium is still a critical challenge. Liquid-liquid extraction (LLE) is a favorable method to recover bioactive compounds from their culture media with preservation of plant cell viability, especially when both production and extraction occur simultaneously [7]. Many

researchers have used a continuous extraction process with an organic solvent directly contacting the aqueous phase, in which the bioconversion is carried out by the plant cells [8].

Extraction of resveratrol from plant parts is usually performed using solid-liquid extraction processes with ethanol [9], methanol [10], or ethyl acetate [11] as solvents. LLE is also used to extract resveratrol from different liquid media and has been shown to recover a large fraction of resveratrol using organic solvents, e.g., chloroform [12], methyl tert-butyl ether [3] and ethyl acetate. The latter is the most used solvent for LLE of resveratrol [5,6]. However, the organic solvent/aqueous medium ratio is usually 1:1 (v/v) thus large amounts of solvent are needed [3,5,6,12–16].

To reduce the volume of organic solvents, solvent supercritical fluid extraction and microwave-assisted extraction have been investigated as potential alternatives [17]. However, these need advanced and costly equipment. Furthermore, many different methodologies have been used to optimize extraction processes by maximizing the physical interactions between polyphenols and solvents, e.g., the response surface methodology [18], and

\* Corresponding author.

E-mail address: [michele.boitel@u-picardie.fr](mailto:michele.boitel@u-picardie.fr) (M. Boitel-Conti).



Hansen solubility parameters (HSPs) [19]; however, solvent volumes were not reduced.

Davis [20] and later Srebrenik [21] deduced a correlation between the partition coefficient of a solute between two solvents and the solubility parameters of the solute and the two solvents. Hiraga et al. [22] correlated the partition coefficients of benzene derivative compounds between ionic liquids (ILs) and carbon dioxide with their solubility parameters. Brookes and Livingston [23] found a good correlation between the membrane/aqueous phase partition coefficient and solubility parameters of organic compounds.

This work attempts to use HSPs as a helpful tool to select a solvent that is immiscible with water and to which resveratrol highly partitions from the aqueous medium, and then to determine another solvent that is separable from the first solvent and to which resveratrol highly partitions from the first solvent. Ideally, the chosen solvents should have physicochemical properties that preserve the aeration of the culture medium and enable the different phases to be easily separated. The parameters of the extraction processes will also be studied. Ultimately, the purpose of this work is to minimize the amount of organic solvents used during the extraction of resveratrol from hairy roots culture medium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

*Trans*-resveratrol (99% purity) and the following solvents: benzyl benzoate (98% purity), methanol (99.8% purity), ethanol (100% purity), ether acetate (99.7% purity), and chloroform (99.9% purity) were purchased from VWR (France). Schenk and Hildebrandt (SH), Gamborg's (B5), Murashige and Skoog (MS) basal salts, vitamin mixtures, and sucrose (99.7% purity) were purchased from Duchefa (Haarlem, Netherlands). Water was deionized and double-distilled.

### 2.2. Calculation of solubility parameters

#### 2.2.1. HSPs calculations

The Hansen solubility parameters, i.e. dispersion ( $\delta_d$ ), polar ( $\delta_p$ ) and hydrogen bonding ( $\delta_h$ ) of 270 solvents were taken from the literature [24] and are tabulated in the supplementary data (Table S1). The HSPs for resveratrol were calculated using the combined group contribution methods of Van Krevelen–Hoftyzer and Fedors [25,26] as follows:

$$\delta_d = \frac{\sum_i F_{d_i}}{\sum_i V_i} \quad (1)$$

$$\delta_p = \frac{\left(\sum_i F_{p_i}^2\right)^{0.5}}{\sum_i V_i} \quad (2)$$

$$\delta_h = \frac{\left(\sum_i E_{h_i}\right)^{0.5}}{\sum_i V_i} \quad (3)$$

where  $i$  is the structural group within the molecule,  $F_{d_i}$  is the group contribution to the dispersion forces,  $F_{p_i}$  is the group contribution to the polar forces,  $E_{h_i}$  is the group contribution to the hydrogen-bonding energy, and  $V_i$  is the group contribution to the molar volume.

The total solubility parameter ( $\delta_t$ ) [24] is calculated from the partial solubility parameters as follows:

$$\delta_t = \left(\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2\right)^{0.5} \quad (4)$$

#### 2.2.2. Partition coefficient calculations using solubility parameters

Srebrenik and Cohen [21] used the following equation to predict the partition coefficient of a drug between two solvents ( $\ln K_{S_2S_1}$ ):

$$\ln K_{S_2S_1} = \frac{V_m^D}{RT} \left[ (\delta_t^{S_1} - \delta_t^D)^2 - (\delta_t^{S_2} - \delta_t^D)^2 \right] + \ln \frac{V_m^{S_1}}{V_m^{S_2}} \quad (5)$$

where  $V_m$  is the molar volume,  $T$  is the temperature (in Kelvin),  $R$  is the gas constant, and superscripts  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $D$  indicate solvent one, solvent two, and the drug, respectively. Positive values of  $\ln K_{S_2S_1}$  mean that the concentration of the drug in solvent two is higher than in solvent one; the higher the value, the higher the concentration of the drug in solvent two compared to solvent one.

The paucity of data on partial molar volumes is the major restriction to the use of Srebrenik equation (5). An important source is the published results of Hildebrand and coworkers [27]. Among them, Srebrenik and Cohen have studied two systems [21]. These are the solutions of iodine and bromine in  $CCl_4$  and  $CS_2$ , for which the experimental partition coefficients have also been given in the literature [28]. Their results confirmed very good agreement between the theoretical and experimental values.

### 2.3. High-performance liquid chromatography (HPLC)

The chemical stability and content of resveratrol in both aqueous and organic phases were determined by HPLC (a pre-column, a LC20AD pump, a SPD10 A diode array detector and a SIL20AC automatic injector, Shimadzu, France). Resveratrol was separated on a C18 Shim-pack column (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m). The HPLC analysis was conducted at 30 °C, and the temperature was controlled using a CTO20AC system column heater. UV detection at 305 nm was used and the mobile phase was (A)  $H_2O$  and (B)  $CH_3CN$ , both with 0.1% formic acid. The flow rate of the mobile phase was 0.4 ml/min using a gradient program of 45 min as follows: initial 0–5 min A:B (95:5); 5–40 min linear change to A:B (50:50); and 40–45 min linear change to A:B (95:5). The injection volume was 5  $\mu$ L. Under these conditions, the retention time of *trans*-resveratrol was 18 min. The chromatographic peak of resveratrol was confirmed by comparing the retention time with that of the reference compound. The linearity of resveratrol concentration versus the measured integration areas was validated using a blank and ten solutions of pure resveratrol in 100% benzyl benzoate with different concentrations (0.01, 0.0125, 0.02, 0.025, 0.1, 0.125, 0.2, 0.25, 0.4, and 0.5 mg/ml), and using another blank and seven solutions of pure resveratrol in half strength Shenck and Hildebrandt ( $\frac{1}{2}$  SH) medium culture [29] used as a nutrition medium for grapevine hairy roots with different concentrations (0.001, 0.002, 0.004, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg/ml). Each concentration was injected three times. The linearity of the calibration for resveratrol in both benzyl benzoate and  $\frac{1}{2}$  SH media was validated.

### 2.4. Resveratrol-selectivity of benzyl benzoate

Benzyl benzoate was evaluated for the selectivity of resveratrol over other stilbenes assumed to be synthesized by grapevine hairy roots and secreted into the culture medium (Tisserant L.P., personal communication).

#### 2.4.1. Non-resveratrol-accumulating hairy roots

Grapevine hairy roots were recently established in our laboratory. These roots, without stress conditions, produce several stilbenes with traces of resveratrol. The best rooting was recorded on half strength Shenck and Hildebrandt medium ( $\frac{1}{2}$  SH) [29] with sucrose 2% w/v as carbon source for 21 days. The grown hairy roots were removed and dried in an oven at 40 °C for 24 h. HPLC was used to confirm the traces amount of resveratrol, thus ensuring

that the transformed grapevine roots used in this study were non-resveratrol-accumulating hairy roots.

#### 2.4.2. Preparation of cell culture media containing the hairy root extract and predetermined amounts of resveratrol

One gram of finely milled and dried non-resveratrol-containing grapevine hairy roots was extracted by a mixture of methanol/water (80:20, v/v) on a rotary shaker (100 rpm) for 24 h at 25 °C in darkness. The extract was then dried using a rotary evaporator (BUCHI Rotavapor R-210/215) at 60 °C. The dried residue was re-dissolved in 100 ml ½ SH culture medium [27], filtered (using 0.20 µm filter MILLEX) and then injected into HPLC. It was considered the blank of resveratrol-containing samples. 0.5 mg of resveratrol was spiked into 50 ml of the filtered medium to prepare a standard solution containing the original stilbenes and 1 mg/100 ml of resveratrol. The standard solution was also injected into HPLC. Benzyl benzoate was then used to extract resveratrol from this standard solution in order to evaluate its selectivity for resveratrol over other compounds. Thus, 0.5 ml of benzyl benzoate solvent was mixed with 50 ml of the standard solution. Extraction was facilitated by centrifugation of the mixture for 20 min at 25 °C (at 4900 rpm) using an Eppendorf 5810 R centrifuge. The benzyl benzoate phase was separated by micropipette then diluted 20 times with benzyl benzoate for injection into HPLC. The aqueous phase was filtered and then directly injected for analysis into HPLC.

The resveratrol selectivity coefficient percentage (S%) for a single-stage extraction process was considered the extracted amount of resveratrol ( $K_f$ ) compared to the total amount of resveratrol with other unwanted by-products ( $K_i$ ):

$$S\% = \frac{K_f}{K_i} \times 100 \quad (6)$$

#### 2.5. Preparation of cell culture media containing predetermined amounts of resveratrol

100 ml of a new autoclaved ½ SH culture medium containing 2% w/v sucrose as carbon source [29] was placed in a 250-ml Erlenmeyer flask, and then different amounts of resveratrol (0.1; 0.4; 1; 2; and 4 mg) were added and dissolved using a vortex for two minutes. The solubility of the highest amount (4 mg resveratrol in 100 ml of medium) was confirmed by HPLC. The effect of different mineral and vitamin compositions and sucrose concentrations on the recovery of resveratrol was tested, using the same procedure. Thus, 1 mg of resveratrol was dissolved in 100 ml of two other widely used media in plant tissue culture, Gamborg's (B5) [30] and Murashige and Skoog (MS) [31] both containing 3% w/v sucrose. This was to investigate the effect of different growth media on the extraction recovery of resveratrol. The pH of all culture media was adjusted between 5.7 and 6, which is the pH of plant cell growth culture media [29–31], with either dilute hydrochloric acid or sodium hydroxide and monitored with a pH meter (Thermo Scientific).

### 2.6. Liquid-liquid extraction experiments

#### 2.6.1. Medium-benzyl benzoate extraction

To determine the most suitable volume of benzyl benzoate, needed to extract resveratrol from mixtures of resveratrol-containing culture medium, each mixture was mixed with different amounts of benzyl benzoate to prepare medium-benzyl benzoate immiscible mixtures at different ratios (100:0.1, 100:0.25, 100:0.5, 100:1, 100:2 and 100:4 v/v). These immiscible mixtures were either - shaken, for 24 h, in a 250 ml-Erlenmeyer

flask (containing 100 ml of mixture) on a rotary shaker at 100 rpm at 25 °C in darkness (shaking method), - vortexed, for one minute, in a 50-ml tubes (containing 50 ml of mixture) at 2500 rpm (IKA MS2 Minishaker) (vortexing method) or - centrifuged, for 20 min, in a 50-ml tubes (containing 50 ml of mixture) using a centrifuge (Eppendorf 5810 at 4900 rpm at 25 °C (centrifugation method).

Other experiments were also conducted to determine the best agitation time required to recover resveratrol from culture media, using one of these agitation methods. The three agitation processes were tested for time periods of (3, 7, 10, 14, 24, and 72 h) for the shaking method, and (1, 5, 10, 20, and 30 min) for the other two methods. The resveratrol-culture medium ratio was fixed at (1:100 w/v) with a medium-benzyl benzoate ratio of (100:1 v/v). For each extraction method, 1 ml samples of the aqueous phases were taken at the different mixing times mentioned then filtered (using 0.20 µm filter MILLEX) before analysis by HPLC. The benzyl benzoate always formed one drop within the medium and sank to the bottom of the containers due to its high density compared to that of water and its complete immiscibility in water [32]. The drop of benzyl benzoate was easily removed using a micropipette (Fig. 1) and its volume was determined to calculate the volume loss ( $V_{\text{loss}}$ ). This benzyl benzoate phase was then filtered and diluted 20 times with pure benzyl benzoate for injection into HPLC.

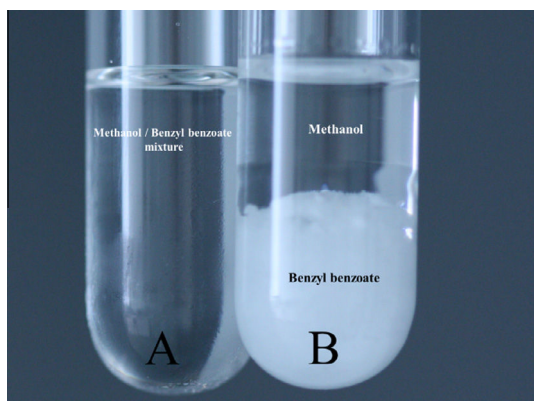
#### 2.6.2. Benzyl benzoate-solvent extraction

After separating benzyl benzoate from the culture medium, resveratrol was extracted from benzyl benzoate by another liquid-liquid extraction process. Methanol, ethanol, and ethyl acetate, which are miscible with benzyl benzoate [33], were chosen depending on calculations to recover resveratrol from benzyl benzoate. These solvents were mixed separately with benzyl benzoate at a ratio of 1:1 v/v. The miscible mixtures were then agitated by centrifugation (4900 rpm, 10 min at 25 °C) followed by freezing at -20 °C (Proline freezer UFZ170) for one hour. In all these mixtures, the solvents stayed in their liquid state while benzyl benzoate was frozen due to its relatively high freezing point of 21 °C [30] and sank to the bottom of the containers (Fig. 2). Then, the upper layer (solvent liquid phase) was rapidly separated from the frozen benzyl benzoate phase using a micropipette, in a cold place (<18 °C). After dilution (20 times) with the same pure solvent, the solvent phase was injected for analysis into HPLC. The benzyl benzoate phase was thawed at ambient temperature in darkness, and then diluted 20 times with pure benzyl benzoate solvent for injection into HPLC.



Fig. 1. Separation of benzyl benzoate from the culture medium using a micropipette.





**Fig. 2.** Miscible mixture of methanol with benzyl benzoate before freezing (A) and separation of benzyl benzoate/methanol phases by freezing (B).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Partition coefficient of resveratrol between different solvents

The HSPs calculations for resveratrol are given in Table 1. These were used to calculate the partition coefficients of resveratrol from water to 270 other different solvents ( $\ln K_{SW}$ ) and from benzyl benzoate to those same different solvents ( $\ln K_{SB}$ ) (Supplementary information, Table S1) using the same forms of Eq. (5):

$$\ln K_{SW} = \frac{V_m^R}{RT} \left[ (\delta_t^W - \delta_t^R)^2 - (\delta_t^S - \delta_t^R)^2 \right] + \ln \frac{V_m^W}{V_m^S} \quad (7)$$

$$\ln K_{SB} = \frac{V_m^R}{RT} \left[ (\delta_t^B - \delta_t^R)^2 - (\delta_t^S - \delta_t^R)^2 \right] + \ln \frac{V_m^B}{V_m^S} \quad (8)$$

**Table 1**

Calculation of HSPs and molar volume for resveratrol according to the Hoftyzer-Van Krevelen method.

Group	Frequency	$F_{d_i}$ ( $\text{J}^{1/2} \text{cm}^{3/2} \text{mol}^{-1}$ )	$F_{p_i}$ ( $\text{J}^{1/2} \text{cm}^{3/2} \text{mol}^{-1}$ )	$E_{h_i}$ (J/mol)	$V_m^*$ ( $\text{cm}^3/\text{mol}$ )
=CH—	5	1000	0	0	67.5
>C=	3	210	0	0	−16.5
Phenylene (o, m, p)	1	1270	12,100	0	52.4
—OH	3	630	750,000	60,000	30
Ring closure 5 or more atoms	1	190	0	0	16
Conjugation in ring for each double bond	3	0	0	0	−6.6
$\Sigma$		3300	762,100	60,000	142.8
$\delta_d = \frac{\Sigma F_{d_i}}{\Sigma V_i}$					23.1 $MP_a^{0.5}$
$\delta_p = \frac{(\Sigma F_{p_i}^2)^{0.5}}{\Sigma V_i}$					6.1 $MP_a^{0.5}$
$\delta_h = \left( \frac{\Sigma E_{h_i}}{\Sigma V_i} \right)^{0.5}$					20.5 $MP_a^{0.5}$
$\delta_t = (\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2)^{0.5}$					31.5 $MP_a^{0.5}$

\* Molar volume is calculated according to Fedors [26].

where superscripts B, R and W indicate benzyl benzoate, resveratrol and water, respectively. The calculations showed that the highest  $\ln K_{SW}$  is 14.3 with methanol, revealing that methanol has the highest ability to extract resveratrol from water (cell culture medium). Ethanol also has a high ability to extract resveratrol from water with  $\ln K_{SW}$  equal to 12.7 (Table 2). However, methanol and ethanol are miscible with water and so cannot be used to extract resveratrol directly from its aqueous cultures. Benzyl benzoate is a dense liquid [32], immiscible with water [32], with a relatively high  $\ln K_{SW}$  of 7.0. Therefore, a small amount of benzyl benzoate can extract a high percentage of resveratrol from cell culture media and separate out at the bottom of the aqueous media making it the most suitable liquid to extract resveratrol from its aqueous cultures. For the recovery of resveratrol from benzyl benzoate in a second-step extraction process,  $\ln K_{SB}$  values were calculated also for 270 solvents (Table S1), then were employed to select the best solvent for the extraction of resveratrol from benzyl benzoate. They demonstrated that methanol was the best solvent for this extraction because it has the highest calculated  $\ln K_{SB}$  value of 7.3 (Table 2). To test this hypothesis, resveratrol was extracted from benzyl benzoate by not only methanol but also two other evaporating solvents, ethanol and ethyl acetate with  $\ln K_{SB}$  ranging from −3.6 to 7.3 (Table 2).

#### 3.2. Choice of solvents

The choice of potential solvents for this process is a crucial step in performing an effective extraction. It was generally determined following a compromise between technical considerations and physicochemical properties [34,35]. To achieve the goal of efficient extraction with a minimum volume of solvent, this solvent must satisfy certain requirements, including a great affinity towards the solute. Another critical property is the ease of recovery of the desired solute from the solvent. Thus, a relatively low boiling point, i.e., high vapor pressure point, is desirable to avoid the large energy consumption by solvent volatilization. The miscibility of ethanol and methanol in water makes them impossible for direct liquid-liquid extraction. Water-immiscible solvents that have a lower density than that of water are also not suitable for direct liquid-liquid extraction of resveratrol in hairy root culture conditions. This is because they will float on the surface of the culture medium and thus prevent air exchange [36].

The physicochemical properties of benzyl benzoate are suitable for this extraction. It is immiscible with water and has a higher density ( $\rho = 1.1 \text{ kg dm}^{-3}$ ) [30]. Moreover, the octanol/water partition coefficients ( $\log P_{oct}$ ) of resveratrol and benzyl benzoate are 3.1 and 3.97, respectively [33,37], so they have similar hydrophobicity and a high affinity for each other. This corresponds to the high calculated value (7.0) of  $\ln K_{SW}$  for benzyl benzoate. Therefore, a small volume of benzyl benzoate extracted resveratrol from the aqueous medium and sank to the bottom of the flask (Fig. 1). However, the boiling point of benzyl benzoate is relatively high (324 °C) with a very low vapor pressure of 0.000224 mmHg at 25 °C [32], which makes the recovery of resveratrol from benzyl benzoate impossible by solvent evaporation. Thus, a second-step liquid-liquid extraction using an evaporating solvent at lower temperature (<80 °C) is needed to recover resveratrol from benzyl benzoate. Methanol, ethanol and ethyl acetate are miscible with benzyl benzoate and melt at −97.8, −144, and −83.8 °C [38], respectively. However, benzyl benzoate has a relatively high melting point of 21 °C [33] compared to those of the other solvents used. This difference was exploited to separate benzyl benzoate from its mixtures by freezing as described above and shown in Fig. 2. Thus, these solvents were used to recover resveratrol from the benzyl benzoate phase in a second-step extraction process. Their ability to extract resveratrol from benzyl benzoate depends

**Table 2**The partition coefficients of resveratrol from water to different solvents ( $\ln K_{SW}$ ) and from benzyl benzoate to other different solvents ( $\ln K_{SB}$ ).

	$\delta_d^a$ ( $MP_a^{0.5}$ )	$\delta_p^a$ ( $MP_a^{0.5}$ )	$\delta_H^a$ ( $MP_a^{0.5}$ )	$\delta_t$ ( $MP_a^{0.5}$ )	$V_m^a$ ( $\text{cm}^3/\text{mol}$ )	$\ln K_{SW}$	$\ln K_{SB}$
Benzyl benzoate	20.0	5.1	5.2	21.3	191.2	7.0	
Ethanol	15.8	8.8	19.4	26.5	58.6	12.7	5.8
Ethyl acetate	15.8	5.3	7.2	18.2	98.6	3.4	-3.6
Methanol	14.7	12.3	22.3	29.4	40.6	14.3	7.3

<sup>a</sup> Data are taken from Hansen [24].

on their  $\ln K_{SB}$  values, which were calculated and are tabulated in Table 2.

According to the calculations and the physicochemical solvent properties discussed above, benzyl benzoate was selected as the best candidate solvent for the medium-solvent extraction process, and methanol as the best, ethanol as an excellent and ethyl acetate as a poor evaporating solvent to extract resveratrol from benzyl benzoate.

### 3.3. High-performance liquid chromatography (HPLC)

The linearity of the calibration for resveratrol in both benzyl benzoate and  $\frac{1}{2}$  SH medium was acceptable with  $R^2 = 0.9983$  and  $R^2 = 0.9989$ , respectively (Supplementary information, Figs. 1S and 2S). The very low concentration of resveratrol of 0.1 mg/100 ml was measurable in the aqueous phase. The highest studied concentrations of 4 mg/100 ml and 4 mg/ml were also within the linearity range in both aqueous and benzyl benzoate phases, respectively. This indicates that these concentrations are still under the saturation point in both phases.

### 3.4. Extraction study

The study of the liquid-liquid extraction process of resveratrol from the culture medium was conducted in order to determine the best conditions leading to a recovery approaching 100% with high selectivity. Several factors, including extraction time and agitation methods, benzyl benzoate/medium ratio, resveratrol/medium ratio, and the nature of the culture medium, were studied to improve resveratrol extraction.

#### 3.4.1. Extraction time and agitation methods

The effect of extraction time and agitation methods on the recovery yield of resveratrol from  $\frac{1}{2}$  SH culture medium was determined at a benzyl benzoate-medium ratio of 1:100 v/v and a resveratrol concentration of 1 mg/100 ml in the medium. The results demonstrated that both parameters influenced the extraction efficiency. For example, 24 h was required to reach the maximum recovery yield ( $69.7 \pm 5\%$ ) by the shaking method but an increase in the extraction time to 72 h did not significantly change the recovery yield ( $t$ -Test:  $P < 0.05$ ) (Fig. 3). A similar extraction yields of  $69 \pm 5$  and  $71.6 \pm 6$  ( $t$ -Test:  $P < 0.05$ ) were obtained by vortexing for one minute and centrifugation for 20 min, respectively. No significant increase in the recovery yields was noticed by increasing the agitation time for vortexing or centrifugation (Fig. 4).

In the tested conditions, vortexing method was more efficient in reducing the extraction time of resveratrol. One minute of vortexing achieved the maximum recovery yield of resveratrol in a single-stage extraction process. This could be due to the different mixing mechanisms and rates applied during the different extraction methods. Shaking uses a slower mixing rate compared to the high speed mixing of a vortexer, while a centrifuge uses a relatively strong centrifugal force to separate phases [35]. This suggests that intensive mixing is required to increase the mass transfer in the

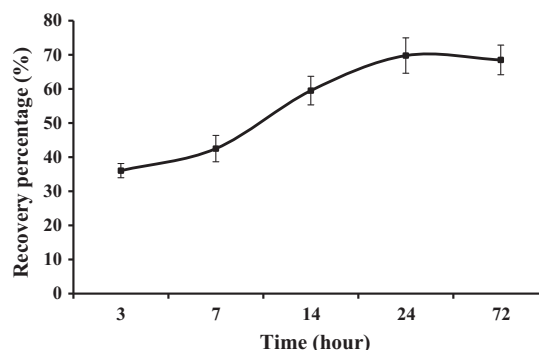


Fig. 3. Effect of extraction time by the shaking method on the recovery percentage of resveratrol.

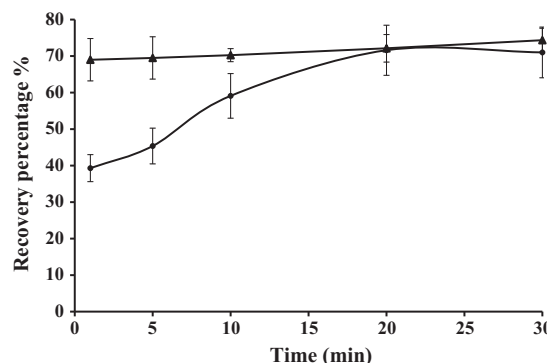


Fig. 4. Effect of extraction time on recovery percentage of resveratrol (1 mg/100 mL) by: ● Centrifugation method, and ▲ vortexing method.

system, and also leads to equilibrium being reached at shorter time scales. The extraction was carried out using the agitation conditions usually applied during the normal culture process of hairy roots, and other stronger agitation methods were tested to explore the possibility of minimizing the extraction time. The shaking method using rotary shakers is usually applied during the growth of hairy root cultures [5,15], therefore shaking for 24 h using a rotary shaker at a speed of 100 rpm at 25 °C in darkness was selected as the extraction method for subsequent studies.

#### 3.4.2. Benzyl benzoate-medium ratio

The benzyl benzoate-medium ratio was changed to evaluate the effect of its volume on the recovery process further. The results showed that the ratio affected the amount of resveratrol extracted from the culture medium (Fig. 5). The recovery ratio of resveratrol increased as the volume of benzyl benzoate increased, reaching the maximum ( $\sim 80\%$ ) at a benzyl benzoate-medium ratio of 4:100 v/v. With a benzyl benzoate-medium ratio of 1:100 v/v, the recovery of resveratrol ( $\sim 70\%$ ) was similar to that of 2:100 v/v ( $73 \pm 4\%$ ), and significantly ( $t$ -Test:  $P < 0.05$ ) higher to that of 0.5:100 v/v ( $60 \pm 4\%$ ), and also comparatively close to that of 4:100 v/v. The

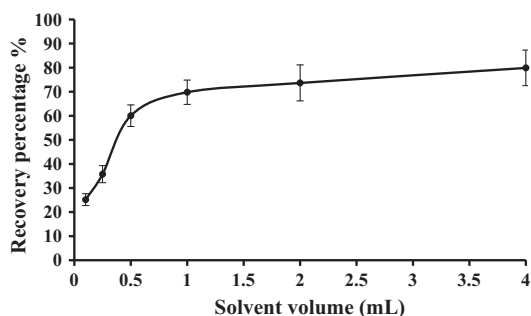


Fig. 5. Effect of benzyl benzoate volume on the extraction recovery of resveratrol (1 mg/100 mL) by the shaking method.

higher interfacial area between the two phases when the volume of benzyl benzoate was increased explains the increase in the recovery. Three subsequent extraction processes with the ratio (1:100 v/v) were enough to recover the total amount of resveratrol (~100%). Benzyl benzoate-medium ratio of 4:100 v/v was more efficient for the extraction of resveratrol. Otherwise, the goal of this work is to reduce markedly the volume of solvents. The ratio of 1:100 v/v is the best, 3 ml are sufficient, in multiple-stage extraction process, to recover the total amount of resveratrol from 100 ml of medium culture. However, 4 ml are needed to recover 80% of resveratrol with a ratio of 4:100 v/v in a single-stage extraction process. Based on these results, a benzyl benzoate-medium ratio of 1:100 v/v was selected to perform further experiments.

The separation of benzyl benzoate from the culture medium was easily performed using a micropipette. However, a slight loss of benzyl benzoate volume ( $V_{\text{loss}}$ ) was noticed, which was relatively independent of the initial volume. This means that, for a solvent volume of 1–4 ml, the solvent loss was on average about 0.07 ml of the total volume. However, for a solvent volume of less than 1 ml, the loss was significantly lower ( $V_{\text{loss}} = 0.02$  ml). The total amounts of resveratrol added to the culture medium were found in the calculations by adding the amount extracted into the organic phase to that remaining in the aqueous phase (Supplementary information, Fig. 3S).

#### 3.4.3. Resveratrol-medium ratio

The effectiveness of the above parameters of the extraction process was investigated when the amount of resveratrol was changed (0.1; 0.4; 1; 2; and 4 mg) in 100 ml of medium. The resveratrol/medium ratio (mg/ml) had a minor effect on the resveratrol extraction (Fig. 6); although a small significant increase was noticed when the amount of resveratrol was increased from 0.1 to 0.4 mg in 100 ml of medium, no significant change occurred when the amount increased further ( $t$ -Test:  $P < 0.05$ ). These results agree with previous reported findings. Wang et al. [3] showed that the

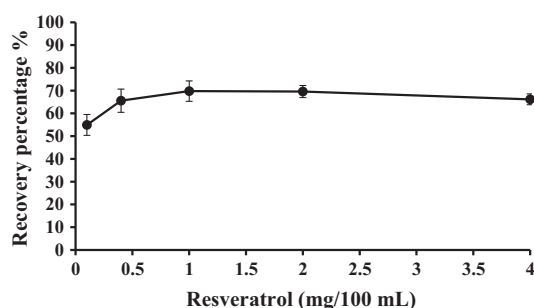


Fig. 6. Effect of resveratrol/medium ratio (w/v, mg/ml) on the recovery of resveratrol by 1 ml of benzyl benzoate using the shaking method.

extraction recovery of resveratrol from its aqueous medium by ethanol (95%) increased when the ratio of the resveratrol increased to reach the maximum at which no significant change occurred.

#### 3.4.4. Effect of the nature of the culture medium on resveratrol recovery

The results showed that changing the culture medium had no significant effect on the recovery of resveratrol, for neither agitation nor centrifugation single-stage extraction methods. The recovery percentages were ~70% irrespective of the medium used (1/2 SH, MS or B5) using the same previous defined conditions, i.e., a benzyl benzoate-medium ratio of 1:100 v/v and a resveratrol-medium ratio of 1:100 mg/ml (Fig. 7).

#### 3.4.5. Benzyl benzoate-solvent extraction

Recovery of resveratrol from benzyl benzoate, by one stage benzyl benzoate/solvent extraction, was  $97 \pm 3\%$ ,  $86 \pm 4\%$  and  $5 \pm 2\%$  using methanol, ethanol and ethyl acetate, respectively, i.e., methanol was the best extractor, ethanol was an excellent extractor and ethyl acetate was not effective. Sun et al. [39] studied the solubility of resveratrol in several aliphatic alcohols including methanol and ethanol and found that it decreased as the carbon number of alcohol solvents increased.

These experimental results verified that the theoretical data obtained from calculations of partition coefficients of resveratrol from benzyl benzoate to other different solvents ( $\ln K_{SB}$ ) are an excellent screening tool to find suitable solvents for LLE. Calculated data in Table 2 show that methanol is the best solvent with the highest  $\ln K_{SB}$  value of 7.3, ethanol is an excellent solvent and ethyl acetate is a poor solvent for extracting resveratrol from benzyl benzoate.

#### 3.5. Resveratrol selectivity

In this extraction procedure, the capacity of benzyl benzoate to extract resveratrol efficiently is essential, while the selectivity for resveratrol over structurally similar stilbenes has the potential to reduce the recovery costs significantly in plant cell culture systems [40]. For this reason, benzyl benzoate was evaluated for the selectivity of resveratrol over other stilbenes assumed to be secreted into the plant cell culture medium. First, the chromatogram from the extract-containing medium spiked with resveratrol was compared with the chromatogram after extraction by benzyl benzoate (Supplementary information, Fig. 4S). The results showed that the selectivity coefficient  $S\%$  for resveratrol over the total extracted compounds was  $92 \pm 3.5\%$ . Therefore, using benzyl benzoate as the organic solvent in an LLE process markedly increases the ratio of resveratrol to other products in the extract stream. One possible

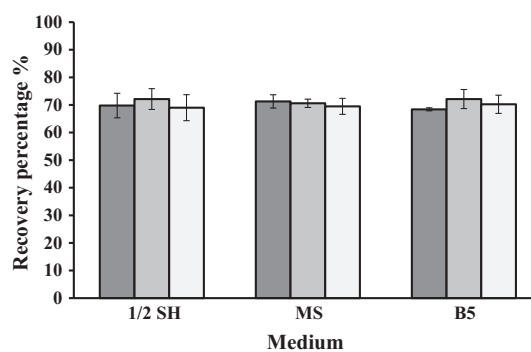


Fig. 7. Resveratrol recovery under conditions of a benzyl benzoate-medium ratio of 1:100 v/v and a resveratrol-medium ratio of 1:100 mg/ml using: ■ Shaking for 24 h, ■ Centrifugation for 20 min, □ Vortexing for 1 min.

explanation for this is the difference in structure between resveratrol and other monomeric stilbenes of *V. vinifera*, which are present in glycosylated forms or in oligomeric and polymeric forms [41]. This increases the hydrophilic properties (more soluble in water) of these compounds compared to resveratrol.

#### 4. Conclusion

Calculations based on solubility parameters were used to predict the partitioning of resveratrol between different liquids. The calculations and the physicochemical properties indicated that benzyl benzoate would be the best liquid to extract resveratrol from its culture medium, and methanol or ethanol would be the best liquid to recover the extracted resveratrol from benzyl benzoate. The growth process conditions of hairy roots in their cultures were mimicked, such as the shaking method, pH, temperature and composition. The ratio of the extracting liquids and the amount of spiked resveratrol in the medium were also manipulated. Thus, the best extraction parameters to extract resveratrol (~100%) from its medium were a three-stage extraction process using benzyl benzoate at a benzyl benzoate/medium ratio of 1:100 v/v and an extraction time of 24 h by shaking. The best parameters to recover resveratrol (~97%) from benzyl benzoate were a single-stage extraction process using methanol at a methanol/benzyl benzoate ratio of 1:1 v/v and freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  to separate the phases. These methods were not only efficient and selective in the recovery of resveratrol but they also reduced organic solvent consumption to the lowest volume ever reported for a conventional liquid–liquid extraction of resveratrol, thus less negative effects resulting usually by the use of high volume of solvents. Cost and time of the extraction are also reduced. Although extraction by vigorous vortexing and centrifugation was more rapid in the tested conditions, extraction by shaking may be used for a direct recovery of resveratrol from the culture medium of hairy roots with preservation of plant cell viability. Further studies are needed on benzyl benzoate solvent biocompatibility and toxicity assays.

#### Acknowledgements

Mohammad Amin Mohammad gratefully acknowledges CARA (The Council for At-Risk Academics, Stephen Wordsworth and Ryan Mundy) for providing the financial support for an academic fellowship.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2016.06.037>.

#### References

- [1] J.A. Baur, D.A. Sinclair, Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 493–506.
- [2] T. Shen, X.-N. Wang, H.-X. Lou, Natural stilbenes: an overview, *Nat. Prod. Rep.* 26 (2009) 916–935.
- [3] D.-G. Wang, W.-Y. Liu, G.-T. Chen, A simple method for the isolation and purification of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*, *J. Pharm. Anal.* 3 (2013) 241–247.
- [4] K.A. Roupe, C.M. Remsberg, J.A. Yáñez, N.M. Davies, Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic, *Curr. Clin. Pharmacol.* 1 (2006) 81–101.
- [5] F. Medina-Bolivar, J. Condori, A.M. Rimando, J. Hubstenberger, K. Shelton, S.F. O'Keefe, et al., Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut, *Phytochemistry* 68 (2007) 1992–2003.
- [6] D. Donnez, K.-H. Kim, S. Antoine, A. Conreux, V. De Luca, P. Jeandet, et al., Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2L stirred bioreactor, *Process Biochem.* 46 (2011) 1056–1062.
- [7] M. Mojaat, A. Foucault, J. Pruvost, J. Legrand, Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of beta-carotene from *Dunaliella salina*, *J. Biotechnol.* 133 (2008) 433–441.
- [8] M.A. Hejazi, C. de Lamarliere, J.M.S. Rocha, M. Vermeu, J. Tramper, R.H. Wijffels, Selective extraction of carotenoids from the microalga *Dunaliella salina* with retention of viability, *Biotechnol. Bioeng.* 79 (2002) 29–36.
- [9] A. Berna, A. Cháfer, J. Montón, High-pressure solubility data of the system resveratrol (3)+ethanol (2)+CO<sub>2</sub> (1), *J. Supercrit. Fluids* 19 (2001) 133–139.
- [10] F. Larronde, J.P. Gaudillère, S. Krisa, A. Decendit, G. Deffieux, J.M. Mérillon, Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants, *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (2014).
- [11] N. Landraut, F. Larronde, J.-M. Mérillon, P.-L. Teissedre, Etude de stilbenes-trans (astringine, resvératrol, picéide) par CLHP-fluorimétrie au cours de la transformation du raisin en vin, *Ann. des Falsif. l'expertise Chim. Toxicol.* 92 (1999) 443–453.
- [12] E. Kübra Inal, S. Öz, A. Atakol, M. Abdülkadir Akay, O. Atakol, Liquid-liquid extraction based simple trans-resveratrol analysis in wine samples, *Suleyman Demirel Univ. J. Sci.* 8 (2013) 114.
- [13] V.M. Burin, N.E. Ferreira-Lima, C.P. Panceri, M.T. Bordignon-Luiz, Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: evaluation of different extraction methods, *Microchem. J.* 114 (2014) 155–163.
- [14] F. Nave, M.J. Cabrita, C.T. da Costa, Use of solid-supported liquid–liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 23–30.
- [15] J. Condori, G. Sivakumar, J. Hubstenberger, M.C. Dolan, V.S. Sobolev, F. Medina-Bolivar, Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: effects of culture medium and growth stage, *Plant Physiol. Biochem.* 48 (2010) 310–318.
- [16] Z. Cai, D. Knorr, I. Smetanska, Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-l-glutamine and insect saliva, *Enzyme Microb. Technol.* 50 (2012) 29–34.
- [17] L. Wang, C.L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci. Technol.* 17 (2006) 300–312.
- [18] M. Rabesiaka, L. Rakotondramasy-Rabesiaka, I. Mabilie, C. Porte, J.-L. Havet, Extraction of trans-resveratrol from red wine and optimization by response surface methodology, *Sep. Purif. Technol.* 81 (2011) 56–61.
- [19] M. Savova, T. Kolusheva, A. Stourza, I. Seikova, The use of group contribution method for predicting the solubility of seed polyphenols of *Vitis vinifera* L. within a wide polarity range in solvent mixtures, *J. Univ. Chem. Technol. Metall.* 42 (2007) 295–300.
- [20] S.S. Davis, Molar attraction constants applied to structure activity relationships, *Experientia* 26 (1970) 671–672.
- [21] S. Srebrenik, S. Cohen, Theoretical derivation of partition coefficient from solubility parameters, *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 996–999.
- [22] Y. Hiraga, W. Endo, H. Machida, Y. Sato, T.M. Aida, M. Watanabe, R.L. Smith Jr., Infinite dilution partition coefficients of benzene derivative compounds in supercritical carbon dioxide + ionic liquid systems: 1-butyl-3-methylimidazolium chloride [bmim][Cl], 1-butyl-3-methylimidazolium acetate [bmim][Ac] and 1-butyl-3-methylimidazolium octylsulfate [bmim][OCSO<sub>4</sub>], *J. Supercrit. Fluids* 66 (2012) 49–58.
- [23] P.R. Brookes, A.G. Livingston, Aqueous-aqueous extraction of organic pollutants through tubular silicone rubber membranes, *J. Membr. Sci.* 104 (1995) 119–137.
- [24] C. Hansen, Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2007.
- [25] D.W. Van Krevelen, P.J. Hoftyzer, Properties of Polymers: Their Estimation and Correlation with Chemical Structure, second ed., Elsevier Scientific Publ., Amsterdam, 1976.
- [26] R. Fedors, A method for estimating both the solubility parameters and molar volumes of liquids, *Polym. Eng. Sci.* 14 (1974) 147–154.
- [27] J.H. Hildebrand, J.M. Prausnitz, R.L. Scott, Regular and Related Solutions, Van Nostrand-Reinhold, New York, NY, 1970.
- [28] A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* 71 (1971).
- [29] R.U. Schenk, A.C. Hildebrandt, Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 199–204.
- [30] O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.* 50 (1968) 151–158.
- [31] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473–497.
- [32] S. Budavari, The Merck Index – Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Merck and Co., Inc., Rahway, NJ, 1989, p. 176.
- [33] M.J. O'Neil, The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Merck and Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, 2006, p. 645.
- [34] J.D. Seader, E.J. Henley, Separation Process Principles, Wiley, New York, 1998.
- [35] P.F. Leal, T.S. Almeida, G.H.C. Prado, J.M. Prado, M.A.A. Meireles, Extraction kinetics and anethole content of fennel (*Foeniculum vulgare*) and anise seed (*Pimpinella anisum*) extracts obtained by Soxhlet, ultrasound, percolation, centrifugation, and steam distillation, *Sep. Sci. Technol.* 46 (2011) 1848–1856.
- [36] K. Kanokwaree, P.M. Doran, The extent to which external oxygen transfer limits growth in shake flask culture of hairy roots, *Biotechnol. Bioeng.* 55 (1997) 520–526.



- [37] M.E. Herbig, D.-H. Evers, Correlation of hydrotropic solubilization by urea with logD of drug molecules and utilization of this effect for topical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 158–160.
- [38] W.M. Haynes (Ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 94th ed., CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 2014, pp. 3–250.
- [39] X. Sun, B. Peng, W. Yan, Measurement and correlation of solubility of *trans*-resveratrol in 11 solvents at T = (278.2, 288.2, 298.2, 308.2, and 318.2)K, *J. Chem. Thermodyn.* 40 (2008) 735–738.
- [40] D. Donnez, P. Jeandet, C. Clément, E. Courot, Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms, *Trends Biotechnol.* 27 (2009) 706–713.
- [41] P. Jeandet, A.-C. Douillet-Breuil, R. Bessis, S. Debord, M. Sbaghi, M. Adrian, Phytoalexins from the vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2731–2741.

---

## DÉVELOPPEMENT DE RACINES TRANSFORMÉES DE VIGNE POUR L'ÉTUDE DES STILBÈNES

---

Ce travail porte sur la mise au point et l'étude d'un nouveau système de culture in vitro permettant une production efficace de dérivés de resvératrol. Pour cela, des lignées de racines transformées de *Vitis vinifera* L. ont été établies, stabilisées et criblées. Le faible taux de croissance a été amélioré par criblage de différents milieux de cultures et différentes concentrations en saccharose, montrant une préférence pour le milieu ½ SH avec 2% (p/v) de saccharose. Les cinétiques de croissance et de production de stilbènes ont ensuite été évaluées dans ces conditions. Nous avons mis en évidence une production basale de stilbènes par les racines, bien que celle-ci soit aussi fortement inductible par des traitements d'élicitation par du méthyl jasmonate et des cyclodextrines. Dans ces conditions, les racines transformées de vigne ont montré une forte capacité de production et d'excrétion de différents stilbènes. Un profilage phytochimique des racines et de leur milieu de culture a été réalisé par CPC-RMN et LC-MS pour illustrer cette diversité. En parallèle des études sur un modèle simplifié, les cultures de cellules en suspension, ont été réalisées pour rechercher des transporteurs candidats pour l'excrétion active du t-resvératrol vers son lieu d'action. Une approche de protéomique globale de la membrane plasmique par iTRAQ a permis de cibler des candidats de type ABC transporteurs, qui ont ensuite été caractérisés par des approches d'étude de l'expression de leurs transcrits. Ensembles, ces résultats soutiennent l'intérêt de cet outil pour l'étude du métabolisme ainsi que pour la bioproduction de stilbènes.

---

*Vitis vinifera* L., racines transformées, stilbènes, t-resvératrol, viniférines, méthyl jasmonate, cyclodextrines, profilage phytochimique, transport.

---

### SETTING UP GRAPEVINE HAIRY ROOT CULTURES FOR THE STUDY OF STILBENES

---

This work aims at the setting up and the study of a new in vitro culture for a cost-effective production of highly pure resveratrol derivatives. To answer that need, hairy root lines of *Vitis vinifera* L. were established, stabilized and screened. Their low growth rate was improved by testing various culture media and different sucrose concentrations. The best growth rate was obtained with ½ SH medium with 2% (w/v) sucrose. The growth and stilbene production kinetics were assessed in these conditions. A constitutive production of stilbenes was observed in roots, though they showed a strong response to eliciting treatments such as methyl jasmonate and cyclodextrines. In these conditions, the hairy roots yielded high stilbene production in terms of concentrations as well as diversity. The diversity of the stilbenes obtained has been described by biochemical profiling of both root and their culture medium extracts using CPC-NMR and LC-MS. Together with the study of hairy roots, we used cell suspensions cultures as a simplified model to study the excretion of t-resveratrol. Candidate transporters have been screened for using a global plasma membrane proteomic approach based of iTRAQ. ABC G transporters were pointed out as promising candidates and were further characterized by studying their gene expression. Together, these results support the interest of grapevine hairy root cultures for the study of stilbenes metabolism and their bioproduction.

---

*Vitis vinifera* L., hairy roots, stilbenes, t-resveratrol, viniferins, methyl jasmonate, cyclodextrins, chemical profiling, transporters.

---

**Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

---

**Spécialité : Biotechnologies végétales**

