



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UMR 1121, INPL-INRA, RP2E
LABORATOIRE AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT

THESE

MODIFICATION DE LA SYNTHÈSE DES
FUROCOUMARINES CHEZ *Ruta graveolens* L. PAR
UNE APPROCHE DE GENIE METABOLIQUE

Présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'INPL
En Sciences Agronomiques**

Par

Sébastien DOERPER

Soutenue le 12 novembre 2008, devant le jury composé de :

M. F. Bourgaud Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy Examineur
M. A. Hehn Maître de conférence, ENSAIA-INPL Nancy Examineur
Mme D. Werck-Reichhart Directeur de recherche, ULP-IBMP, Strasbourg Rapporteur
M. B. Saint-Pierre Professeur, UFR, Tours Rapporteur
M. E. Gontier Professeur, UPJV, Amiens Invité
Mme D. Laurain-Mattar Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy Invitée

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein de l'UMR 1121, Laboratoire Agronomie et Environnement Nancy Université - INRA Nancy-Colmar.

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Sylvain Plantureux, Professeur à l'ENSAIA et Directeur de l'UMR 1121, de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche.

Je remercie les chercheurs qui ont accepté de participer au jury de cette thèse : Madame Danièle Werk-Reichhart, Directeur de recherche CNRS à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes de Strasbourg et Monsieur Benoît Saint-Pierre, Professeur à l'Université François Rabelais de Tours, qui seront les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Madame Dominique Laurrain-Mattar, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy, qui a accepté de participer à cette soutenance en tant qu'invitée. J'attends leurs critiques et leurs jugements sur ce travail de recherche.

Je tiens plus particulièrement à remercier Monsieur Frédéric Bourgaud, Professeur à l'ENSAIA et Directeur de thèse. Je le remercie de la confiance qu'il m'a témoignée en me prenant comme thésard. Merci d'avoir réuni les conditions nécessaires au bon déroulement de mes travaux.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Docteur Alain Hehn, maître de conférence à l'ENSAIA et co-directeur de thèse. Je le remercie de la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ma thèse. Merci pour la disponibilité, l'écoute, l'aide et le soutien moral dont il a fait preuve à mon égard. Je ne le remercierai jamais assez pour toute l'énergie et le temps qu'il a consacré à corriger ce manuscrit.

Remerciements

Je remercie Monsieur Eric Gontier, Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne d'Amiens pour son soutien moral lorsqu'il était encore sur Nancy. Je le remercie de s'être autant impliqué et de la grande disponibilité dont il a fait preuve.

Je remercie toutes les personnes (Stéphanie, Stéphane, Serge et les autres dont j'ai oublié le prénom) qui ont participé de près ou de loin à mes travaux. Merci à Monsieur Bertrand Aigle de m'avoir permis d'utiliser la PCR en temps réel située à la Faculté des Sciences de Vandoeuvre-les-Nancy. Merci à Stéphane Hacquard pour l'aide qu'il me donne à chaque fois que je vais faire une PCR quanti à Champenoux. Je tiens également à adresser mes remerciements à Madame Catherine Lapierre (INRA Paris-Grignon) pour avoir réalisé les analyses de lignines de rue.

Je voudrais simplement exprimer mes remerciements à toutes les personnes travaillant au laboratoire pour avoir su entretenir une ambiance remarquable. Merci à Thamara, Mina, Martine, Bernard, Christophe, Sophie et toute l'équipe que je ne cite pas en entier (par peur d'en oublier un). Je n'oublie pas les thésards qui se sont succédés ces 4 années passées (Minh, Romain, Sébastien, Boris, Dao, Robert, Camille, Mickael, Lama, Flore, Etienne et le petit nouveau Guilhem. Merci à Sissi et Etienne, collègues de bureau, qui mettent une ambiance extraordinaire (surtout Sissi qui fait le singe en face de moi). Je manquerais à tous mes devoirs si je ne parlais pas de Christelle, Amandine, µseb et Serge avec qui on a passé une année exceptionnelle à rire, rire et rire.

Je fais une spéciale dédicace à Emmanuelle Personneni, qui suite à notre aventure, a donné naissance à notre enfant Pipo. J'espère qu'elle nous reviendra un jour de Caen (les gens sont plutôt spéciaux par là bas). Merci à Flore Biteau d'avoir été mon alliée et confidente pendant les périodes sombres et difficiles (surtout la fin de thèse).

Je remercie mes fidèles amis, Christelle, Séverine, Christine, Pål, Jean-Luc, Nao, Vincent, Murielle, Michel, qui ont toujours été présents dans les moments importants de ma vie. Pourvu que ça dure !

Remerciements

Je remercie également mes « vieux amis » de fac qui sont là depuis mes débuts à Nancy. Merci à Pascaline, Laetitia, Marie, Céline et leur conjoint respectifs qui me suivent depuis le DEUG. Merci à Julie, Caroline et Elyette mes amies biochimistes.

Je tiens également à saluer mes collègues du Centre Antipoison de Nancy et de Toxicovigilance qui m'ont accueilli au sein de leur service. Merci au Docteur Luc Ferrari.

Je voudrais aussi saluer mes jeunes amis « bébés Apothicaires » (Charlotte la poliotte, Coralie, les Malvaceae, Maître Duval) qui m'ont accepté au sein de la prestigieuse famille des Pharmaciens.

Je garde le meilleur pour la fin. Merci à toute ma famille (parents, beaux parents, frère, oncles, tantes, cousins, cousines, ...et mon filleul) de me donner tout leur amour et leur confiance, ce en quoi, rien de tout cela n'aurait été possible. Malgré les joies, les tristesses et toutes les difficultés de la vie quotidienne, la famille reste le sanctuaire où l'on peut se ressourcer. Je remercie aussi ma belle famille qui m'a accueilli en son sein. Je suis éternellement reconnaissant envers mes beaux parents d'avoir su trouver les arguments pour me motiver à reprendre des études en Pharmacie.

Et enfin, je souhaite dédicacer ce travail de thèse à deux personnalités exceptionnelles qui ont pris chacune une place importante mais différente dans ma vie. En premier lieu, je remercie ma défunte grand-mère d'avoir contribué à mon éducation et d'avoir fait de moi ce que je suis. En second lieu, la personne qui mérite le plus de figurer dans ce manuscrit n'est autre que Thomas. Au fil des années il a su m'épauler, me soutenir, me guider dans mes choix tant personnels que professionnels. Ne lui parlez surtout plus de *Ruta graveolens*, de furocoumarines ou de plantes génétiquement transformées, il en a assez entendu et lu pour une paire d'années.

Table des matières

<i>Table des matières</i>	1
<i>Table des figures et tableaux</i>	7
<i>Abbreviations</i>	11
<i>Nom vernaculaire des espèces citées</i>	13
<i>Chapitre I : Synthèse bibliographique</i>	15
1 Les Furocoumarines	15
1.1 Les furocoumarines : généralités	15
1.1.1 Structures générales et propriétés physicochimiques	15
1.1.2 Distribution dans le règne végétal	16
1.1.3 Rôles écologiques des furocoumarines	17
1.1.4 Propriétés biologiques des furocoumarines	18
1.1.4.1 Réactivités avec les acides nucléiques	18
1.1.4.2 Réactivité avec les lipides	20
1.1.4.3 Réactivité avec les protéines	21
1.1.4.4 Inhibition enzymatique	21
1.1.4.5 Photooxydation	22
1.1.5 Les furocoumarines linéaires en thérapeutique	22
1.2 Les furocoumarines linéaires: voie de biosynthèse et localisation au sein de la plante	23
1.2.1 Voie des phénylpropanoïdes	23
1.2.2 Biosynthèse des furocoumarines linéaires	26
1.2.3 Régulations de la voie de biosynthèse	29
1.2.3.1 Elicitations de la biosynthèse	30
1.2.3.2 Régulations au niveau transcriptionnel	30
1.2.3.3 Régulations post-transcriptionnelles et rétrocontrôles enzymatiques	31
2 <i>Ruta graveolens</i> L.	32
2.1 Description botanique	32
2.2 Localisation et stockage des furocoumarines	34
2.3 Intérêt du modèle <i>Ruta graveolens</i> pour la production de furocoumarines	35
2.3.1 Production en champ	36
2.3.2 Cultures <i>in vitro</i>	37
3 Les cytochromes P450	39
3.1 Cytochromes P450 : généralités	39
3.1.1 Définition	39
3.1.2 Classification	40

Tables des matières

3.1.3	Nomenclature	41
3.1.4	Structure	42
3.1.5	Relation structure activité	43
3.1.5.1	Cycle catalytique et pouvoir réducteur des P450 monooxygénases de type II	43
3.1.5.2	Inactivation autocatalytique	44
3.2	Fonctions des P450 végétaux	46
3.2.1	Rôles des P450 dans les voies de biosynthèse	46
3.2.2	P450 et métabolisation de xénobiotiques	46
3.3	Cytochromes P450 clés dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes	48
3.3.1	La cinnamate 4-hydroxylase	49
3.3.2	La coumaroyl ester 3'-hydroxylase	50
3.3.3	La psoralène synthase	51
4	La transformation génétique chez les végétaux supérieurs	52
4.1	Les différentes techniques de transformations	52
4.1.1	Les méthodes de transferts directs	52
4.1.1.1	Par biolistique / agrolistique	52
4.1.1.2	Par micro-injection	53
4.1.1.3	Par électroporation	53
4.1.1.4	Par lipofection	53
4.1.2	Les méthodes de transferts indirects	54
4.2	Mécanisme naturel de transformation par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	55
4.2.1	Support moléculaire de la virulence	55
4.2.2	Chimiotactisme et induction de la virulence	57
4.2.3	Transfert et intégration de l'information génétique	58
4.2.4	Mise en place du commensalisme	60
4.3	Utilisation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pour la transformation génétique	60
4.3.1	Le système de co-intégration	61
4.3.2	Le système binaire	61
4.3.3	Les gènes de sélection	62
4.3.4	Choix d'un protocole de transformation génétique	63
5	Objectifs de recherche : exploration fonctionnelle de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes	65
	Chapitre II : Matériel et méthodes	67
1	Matériel	67
1.1	Matériel végétal : <i>Ruta graveolens</i> L.	67
1.2	Souches bactériennes	67
1.3	Matériel plasmidique	68
1.3.1	Plasmides de départ	69

1.3.2	Plasmides recombinants	71
2	Milieux de culture	73
2.1	Milieux pour cultures végétales	73
2.2	Milieux pour cultures bactériennes	73
2.3	Antibiotiques utilisés	74
3	Méthodes de biologie moléculaire	75
3.1	Extractions d'ADN génomique de feuilles de <i>Ruta graveolens</i>	75
3.2	Amplification d'un fragment d'ADN par PCR	76
3.3	Extraction d'ARN de feuilles de <i>Ruta graveolens</i> L	77
3.4	Synthèse d'ADNc	78
3.5	Extraction d'ADN plasmidique	78
3.6	Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	79
3.7	Extraction d'ADN d'un gel d'agarose	79
3.8	Digestion par enzymes de restriction	79
3.9	Purification et précipitation d'un ADN digéré	80
3.10	Ligations	80
3.11	Construction d'un vecteur de destination Gateway®	81
3.12	Recombinaison par la technologie Gateway®	83
3.13	Préparation de bactéries électrocompétentes	83
3.14	Transformation génétique de bactéries par électroporation	84
3.15	Transformation génétique de bactéries par choc thermique	84
3.16	Séquençage	85
4	Méthode de transformation génétique de <i>R. graveolens</i>	85
4.1	Conjugaison triparentale	86
4.2	Préparation de l'inoculum d'agrobactéries	87
4.3	Germination de graines de <i>Ruta graveolens</i> L	87
4.4	Transformation génétique d'hypocotyles de <i>Ruta graveolens</i>	88
5	Méthodes biochimiques	89
5.1	Extraction éthanolique de phénylpropanoïdes	89
5.2	Extraction des lignines de <i>Ruta graveolens</i>	89
5.2.1	Principe de la thioacidolyse	89
5.2.2	Extraction des lignines	91
6	Méthodes analytiques	91
6.1	Dosage de composés phénylpropanoïdes par HPLC	91
6.2	Dosage des lignines	92
6.3	Quantification du nombre de transcrits par real time PCR	93
7	Traitement statistique des données	94

Chapitre III : Modification de la voie des phénylpropanoïdes de *Ruta graveolens* par génie métabolique _____ **95**

1	Transformants K-73A32	96
1.1	Mise à disposition du matériel biologique	96
1.2	Caractérisation moléculaire des transformants K-73A32	97
1.3	Dosage de la teneur en furocoumarines des transformants K-73A32	100
1.4	Quantification du nombre de transcrits C4H	103
1.4.1	Introduction à la PCR en temps réel : justification du choix du gène rapporteur	103
1.4.2	Introduction à la PCR en temps réel : choix des amorces	105
1.4.3	Comportement du gène C4H au niveau transcriptionnel	107
2	Transformants S-98A22	109
2.1	Construction du plasmide pBIN-GW	110
2.2	Construction du plasmide pBIN-GW-98A22	112
2.3	Obtention des transformants CYP98A22	115
2.4	Caractérisation moléculaire des transformants S-98A22	116
2.5	Dosage des phénylpropanoïdes	118
2.6	Dosage des lignines	122
2.7	Quantification du nombre de transcrits C4H et C3'H	124
2.7.1	Choix des amorces	125
2.7.2	Comportement des gènes C4H et C3'H au niveau transcriptionnel	125
3	Transformants S-98A3	127
3.1	Construction de pBIN-GW-98A3	127
3.2	Obtention des transformants S-98A3	129
3.3	Caractérisation moléculaire des transformants	130
3.4	Dosage des phénylpropanoïdes	132
3.5	Quantification du nombre de transcrits C4H et C3'Hs	135
3.5.1	Choix des amorces	136
3.5.2	Comportement des gènes C4H et C3'H au niveau transcriptionnel	137
4	Transformants S-98A22INV	138
4.1	Construction de pBIN-GW-98A22INV	138
4.2	Obtention des transformants S-98A22INV	139
4.3	Caractérisation moléculaire des transformants S-98A22INV	141
4.4	Dosage des phénylpropanoïdes	142
4.5	Dosage des lignines des transformants S-98A22INV	145
4.6	Quantification du nombre de transcrit C4H et C3'H	147
4.6.1	Choix des amorces	147
4.6.2	Comportement des gènes C4H et C3'H au niveau transcriptionnel	147

Tables des matières

5	Transformants S-71AJ1	148
5.1	Construction de pBIN-GW-71AJ1	149
5.2	Obtention des transformants S-71AJ1	150
5.3	Caractérisation moléculaire des transformants S-71AJ1	151
5.4	Dosage des phénylpropanoïdes	152
5.5	Quantification du nombre de transcrit C4H, C3'H, et PS	156
5.5.1	Choix des amorces	156
5.5.2	Comportement des gènes C4H, C3'H et PS au niveau transcriptionnel	157
Chapitre IV : DISCUSSION		159
Annexes :		169
1	Composition du milieu MS	169
2	GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)	170
3	QIAEX II : extraction d'ADN d'un gel d'agarose	172
Références bibliographiques		175

Table des figures et tableaux

Figure 1 (A, B) : (A) Structure chimique d'une furocoumarine linéaire (psoralène). (B) structure chimique d'une furocoumarine angulaire (angélicine).	15
Figure 2 (A, B, C) : Photocycloadditions possibles du psoralène sur une base thymine. (A) Photoaddition monovalente sur les carbones 2' et 3' du psoralène. (B) Photoaddition bivalente sur les carbones 3, 4 et 2', 3' du psoralène. (C) Photoaddition monovalente sur les carbones 3 et 4 du psoralène. (Song and Tapley 1979)...	19
Figure 3 : Photocycloaddition croisée entre une furocoumarine et deux thymines au sein de la double hélice d'ADN. (Edelson 1988).....	20
Figure 4 : Photocycloaddition entre le psoralène avec le méthyl ester d'acide linoléique (Dall'Acqua and Martelli 1991).....	21
Figure 5 : Représentation de la voie de biosynthèse de la phénylalanine.	24
Figure 6 : Squelette de base d'un phénylpropanoïde type.....	24
Figure 7 : Représentation partielle de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. PAL : Phénylalanine Amonia-Lyase ; TAL : Tyrosine Amonia-Lyase ; C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase ; 4CL : p-Coumarate CoA Ligase.....	25
Figure 8: Voie de biosynthèse des furanocoumarines linéaires chez <i>R. graveolens</i> L. La voie passant par la formation de la 8-hydroxymarmésine est hypothétique. C2H : Coumaroyl 2-Hydroxylase ; DMAT : DiMéthylAllyl Transférase ; MS : Marmésine Synthase ; PS : Psoralène Synthase ; P5(8)MO : Psoralène 5(8) MonoOxygénase ; X(B)OMT : Xanthotoxol (Bergaptol) O-Méthyl Transférase.	27
Figure 9 (a, b) : (a) Arbrisseau de <i>Ruta graveolens</i> L à l'état sauvage. (b) planche botanique de rue (http://botanical.com/).	33
Figure 10 : Photo de feuille et de fleurs de <i>Ruta graveolens</i> L.....	33
Figure 11 : Chambre de culture.....	38
Figure 12 : Exemples de diversité réactionnelle de P450 (Mansuy 1998).....	39
Figure 13 : Modèle d'une structure tertiaire de P450 monooxygénases. La protoporphyrine IX (hème) est en orange, les sites de reconnaissance du substrat (SRS1–SRS6) sont en rouge et les hélices I et L coordonnées à l'hème sont en vert (Urlacher and Eiben 2006).	42
Figure 14 : Cycle catalytique d'un P450 monooxygénase. (http://metallo.scripps.edu/PROMISE/P450.html)...	44
Figure 15 : Carte génétique du plasmide Ti d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56
Figure 16 : Modèle de la biogenèse du T-pilus d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
Figure 17 : Polylinker du plasmide pCR8®/GW/TOPO®.....	70
Figure 18 : Plasmide pGEM-T.....	71
Figure 19 : Représentation d'une cassette de conversion Gateway®. Les sites attR1 et attR2 flanquent le gène ccdB et le gène de résistance au chloramphénicol.....	81
Figure 20 : Caractéristiques principales des 3 cassettes Gateway®.....	82
Figure 21 : Principe de la méthode employée pour évaluer la structure des lignines des tiges de rue témoin et transgéniques..	90
Figure 22 : Jeune plant de rue venant d'être repiqué dans un nouveau milieu nutritif MS(30).....	96

Table des figures et tableaux

Figure 23 : Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rue témoin sauvage (WT) et de rue transgénique (K.) avec le gène codant pour la C4H de <i>R. graveolens</i>	101
Figure 24 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines dosées dans un échantillon de rues témoins (WT) ainsi que dans l'ensemble des rues transformées (K-73A32) avec le gène codant pour la C4H de <i>R. graveolens</i>	102
Figure 25 : Cinétique complète d'une réaction de polymérisation.	103
Figure 26 : Courbe de fusion unimodale.	105
Figure 27 : Niveaux relatifs de transcrits C4H obtenus par analyse en RT-PCR en temps réel pour un échantillon de rues témoins (WT) et les plantes transgéniques K-73A32 (K.).	107
Figure 28 : Evolution de la quantité relative de transcrits C4H suite à une exposition aux UV ($\lambda = 254$ nm) de 15 minutes.	109
Figure 29 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase ; C3'H : ester de Coumaroyl 3'-Hydroxylase ; PS : Psoralène synthase.	110
Figure 30 : (a) Profils de digestions théoriques des plasmides pBIN-GW	111
Figure 31 : (a) Profils de digestions théoriques du plasmide pBIN-GW digéré par les enzymes de restrictions BglII, PvuII et EcoRI.....	112
Figure 32 : (a) Profils de digestions théoriques des plasmides pCR8-GW-98A22	113
Figure 33 : Plasmide pBIN-GW-98A22	114
Figure 34 : (A, B) Hypocotyles de rue transformées génétiquement (sélection).....	115
Figure 35 : Tiges feuillées sur milieu sélectif (C) avant repiquage en pot individuel (D).	116
Figure 36 : Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rues témoins (WT) et de rues transformées (S-98A22) avec le gène codant pour la C3'H de <i>R. graveolens</i>	119
Figure 37 : Chromatogrammes HPLC/DAD correspondants à l'analyse métabolique du transformant S-98A22-2 (en rouge, 56 mg de MS) et d'une rue témoin (en noir, 42 mg de MS).....	120
Figure 38 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines (valeurs cumulées) dosées dans un échantillon de rues témoins (WT) ainsi que dans l'ensemble des rues transformées (S-98A22) avec le gène codant pour la C3'H de <i>R. graveolens</i>	121
Figure 39 : Valeurs moyennes exprimées en unités arbitraires par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine dosés dans un échantillon de rues témoins (WT) ainsi que dans l'ensemble des rues transformées (S-98A22) avec le gène codant pour la C3'H de <i>R. graveolens</i>	122
Figure 40 : Niveaux relatifs des transcrits C4H et C3'H (cyp98A22) obtenus par analyse en RT-PCR en temps réel pour un échantillon de rues témoins (WT) et de plantes transgéniques (S-98A22).	126
Figure 41 : (a) Profils de digestions théoriques des plasmides pCR8-GW-98A3	128
Figure 45 : Plasmide pBIN-GW-98A3	129
Figure 46 : Rues potentiellement transformées avec la construction 35S::cyp98A3 en culture in vitro.	130
Figure 44: Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rues témoins (WT) et de rues transformées (S-98A3).....	133
Figure 45 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines dosées dans un échantillon de rues témoins (WT) ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec le gène codant pour la C3'H d' <i>A. thaliana</i> (S-98A3).....	133

Table des figures et tableaux

Figure 46 : Valeurs moyennes exprimées en unités arbitraires par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine dosés dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec le gène codant pour la C3'H d'A. thaliana.	135
Figure 50 : Niveaux relatifs des transcrits C4H et C3'H (cyp98A22).....	137
Figure 51 : Plasmide pBIN-GW-98A22INV.....	139
Figure 52 : Rues potentiellement transformées avec la construction 35S::98A22INV cultivés en in vitro.....	140
Figure 50 : Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rues témoins et de rues transformées avec la séquence codante inversée du gène codant pour la C3'H de R. graveolens.....	143
Figure 51 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines (valeurs cumulées des trois précédents) dosées dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec la séquence codante inversée du gène codant pour la C3'H de R. graveolens.	143
Figure 52 : Valeurs moyennes exprimées en unités arbitraires par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine dosés dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec la séquence antisens du gène codant pour la C3'H de R. graveolens.. .	144
Figure 53 : Niveaux relatifs des transcrits C4H et C3'H (cyp98A22).	148
Figure 54 : (a) Profils de digestions théoriques des plasmides pCR8-GW-71AJ1	150
Figure 55 : Tiges feuillées de rues potentiellement transformées avec la construction 35S::71AJ1 cultivées en in vitro.	151
Figure 56 : Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rues témoins et de rues transformées avec le gène codant pour la PS d'A. majus	153
Figure 57 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines (valeurs cumulées des trois précédents) dosées dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec le gène codant pour la Psoralène Synthase d'A. majus.	154
Figure 58 : Valeurs moyennes exprimées en unités arbitraires par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine dosés dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec le gène codant pour la PS d'A.majus.....	155
Figure 62 : Niveaux relatifs des transcrits C4H, C3'H (cyp98A22) et PS obtenus par analyse en RT-PCR en temps réel pour un échantillon de rues témoins (WT) et de plantes transgéniques (S-71AJ1).	157
Figure 63 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase ; C3'H : ester de Coumaroyl 3'-Hydroxylase ; PS : Psoralène Synthase.....	161
Figure 64 : Représentation hypothétique de la métabolisation du p-coumarate chez R. graveolens.	164

Table des figures et tableaux

<i>Tableau 1 : Variations de la teneur et du rendement en furocoumarines chez Ruta graveolens</i>	36
<i>Tableau 2 : Liste non exhaustive de P450 impliqués dans les voies de biosynthèse des glucosinolates, des phénylpropanoïdes, des lipides oxydés, des terpènes et des alcaloïdes.</i>	48
<i>Tableau 3 : Concentrations des solutions mères d'antibiotiques et solvants utilisés.</i>	74
<i>Tableau 4 : concentrations finales d'antibiotiques</i>	75
<i>Tableau 5 : Résultats de l'amplification des gènes nptII et 35S::cyp73A32 sur de l'ADN génomique</i>	99
<i>Tableau 6 : amorces utilisées en PCR quantitative.</i>	106
<i>Tableau 7 : Résultats de l'amplification des gènes nptII et 35S::cyp98A22 sur de l'ADN génomique</i>	118
<i>Tableau 8 : Résultats de thioacidolyse de tiges de rues témoins (WT) et de deux individus transformés avec la construction 35S::CYP98A22.</i>	123
<i>Tableau 9 : amorces utilisées en PCR quantitative.</i>	125
<i>Tableau 10: Résultats de l'amplification des gènes nptII et 35S::cyp98A3 sur de l'ADN génomique</i>	131
<i>Tableau 11 : amorces utilisées en PCR quantitative.</i>	136
<i>Tableau 12 : Résultats de l'amplification des gènes nptII et 35S::cyp98A22INV sur de l'ADN</i>	141
<i>Tableau 13 : Résultats de thioacidolyse de tiges de rues sauvages (WT) et de rues transformées avec la construction 35S::98A22INV (S-98A22INV)</i>	145
<i>Tableau 14 : Résultats de l'amplification des gènes nptII et 35S::cyp71AJ1 sur de l'ADN génomique</i>	152
<i>Tableau 15 : amorces utilisées en PCR quantitative.</i>	156
<i>Tableau 16 : principales modifications observées au niveau des concentrations en composés phénoliques ainsi qu'au niveau transcriptionnel pour chaque famille de transformants obtenus.</i>	160

Abbréviations

35S : un des promoteurs du virus de la mosaïque du chou fleur
5-MOP : 5-MéthOxyPsoralène ; bergaptène
5,8-MOP : 5,8-MéthOxyPsoralène ; isopimpinelline
8-MOP : 8-MéthOxyPsoralène ; xanthotoxine
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADN-T : ADN de transfert
ARN : Acide RiboNucléique
BAP : BenzylAminoPurine
BAP(0,1) : BAP à la concentration de 1 g/L
C2H : Cinnamate/*p*-Coumarate-2-Hydroxylase
C3'H : ester de *p*-coumaroyl 3'-hydroxylase
C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase
CO : monoxyde de carbone
CYP : CYtochrome P450
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
F2H : Férulate 2-Hydroxylase
F3'H : Flavonoïde 3'-Hydroxylase
F3'5'H : Flavonoïde 3',5'-Hydroxylase
F5H : Férulate 5-Hydroxylase
F6H : Flavonoïde 6-Hydroxylase
FAD : Flavine Adénine Dinucleotide
FMN : Flavine MonoNucleotide
GFP : Green Fluorescent Protein
GW : Gateway[®]
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
IEF : focalisation isoélectrique
LB : Luria Bertani
MBI : Mechanism Based Inactivators
MS : Murashige et Skoog
MS(30) : MS contenant 30 g/L de saccharose
NAA : Acide Naphtalène Acétique
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide, forme réduite
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite
NO : Monoxyde d'azote
NO₂ : Dioxyde d'azote
PAL : Phénylalanine Ammonia-Lyase
pBIN-GW-X : correspond aux plasmides recombinants pBIN-GW

Abbreviations

PCR : Polymerase Chain Reaction

pCR8-GW-X : correspond aux plasmides recombinants pCR8-GW-X

pI : point iso-électrique

P-UVA : Psoralène-UVA-Thérapie

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

TAE : Tris Acétate EDTA

Taq : *Thermus aquaticus*

TAL : Tyrosine Ammonia-Lyase

Ti : Tumor inducing

UV : Ultra-Violet

YAC : Yeast Artificial Chromosome

Nom vernaculaire des espèces citées

Ammi majus : Queen Anne's Lace

Apium graveolens : Céleri

Arabidopsis thaliana : Arabette des dames

Cicer arietinum : Pois chiche

Citrus bergamia : Bergamotier

Citrus lemon : Citronnier

Citrus paradisi : Pomelo

Coffea anephora : Caféier robusta

Coronilla sp. : Coronille

Daucus carota L. : Carotte

Ficus carica : Figuier

Ginkgo biloba : Ginkgo biloba, arbre aux quarante écus, arbre aux mille écus

Helianthus tuberosus : Topinambour

Leucojum aestivum : Nivéole d'été

Nicotiana tabacum : Tabac

Ocimum basilicum : Basilique

Pastinaca sativa : Panais

Petroselinum crispum : Persil

Pisum sativum : Petit pois

Populus tremuloides : Peuplier faux-tremble

Psoralea cinerea : Psoralée

Ruta graveolens : Rue officinale, rue fétide, rue commune, herbe de Grâce

Saccharomyces cerevisiae : Levure de boulanger

Solanum lycopersicum : Tomate

Sophora japonica : sophora japonais, pagode japonaise

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1 Les Furocoumarines

1.1 Les furocoumarines : généralités

1.1.1 Structures générales et propriétés physicochimiques

Les furocoumarines sont des métabolites secondaires appartenant à la grande famille des phénylpropanoïdes. Ce sont des molécules tricycliques, produites par la condensation de deux hétérocycles : coumarine (benzo- α -pyrone ou 1,2-benzopyrone) et furane. Il existe une correspondance dans la structure biochimique entre les acides aminés aromatiques et l'acide cinnamique, précurseur des phénylpropanoïdes. En effet, ces composés phénoliques se forment au cours de la même voie métabolique. Il y a donc dépendance du métabolisme secondaire envers le métabolisme primaire.

Les furocoumarines constituent une classe de molécules diversifiée chimiquement, où chaque membre se distingue par la présence de divers groupements (hydroxy, alkoxy, géranyloxy...) sur les carbones 2, (Matern U. *et al.* 1988). On distingue deux types de furocoumarines en fonction de la position du noyau furane sur l'hétérocycle coumarine. Le premier groupe est celui des furocoumarines linéaires (Figure 1A) qui comprend le psoralène et ses dérivés. Le second groupe, celui des furocoumarines angulaires (Figure 1B), est quant à lui, représenté par l'angélicine et ses dérivés.

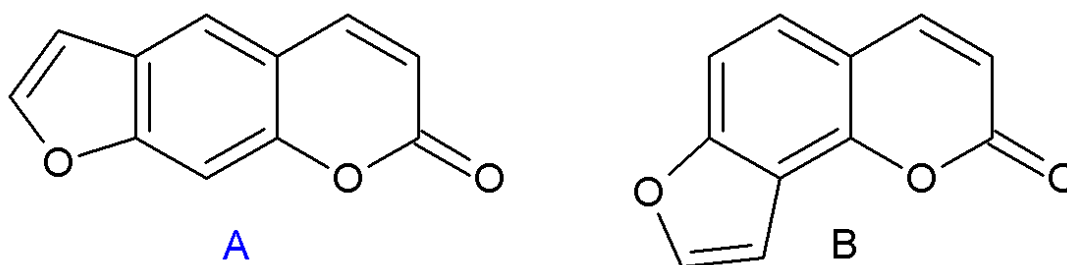


**Figure 1 (A, B) : (A) Structure chimique d'une furocoumarine linéaire (psoralène).
(B) structure chimique d'une furocoumarine angulaire (angélicine).**

De par leur structure chimique, les furocoumarines présentent une bonne solubilité dans les solvants aprotiques polaires comme l'acétonitrile et le chloroforme, mais également dans certains solvants protiques polaires tels que le méthanol et l'éthanol, mais sont peu solubles dans l'eau. Ce sont des molécules relativement stables qui résistent bien aux températures élevées. Toutefois, cette stabilité diminue lorsqu'on les soumet à un rayonnement UV. Les substituants présents sur le noyau coumarine, qui varient selon les furocoumarines, leur confèrent différentes propriétés physico-chimiques. L'ensemble de ces propriétés fait des furocoumarines des molécules qu'il est possible de séparer et de caractériser par les techniques de chromatographie sur couche mince (CCM), de chromatographie gazeuse (GC), et de chromatographie liquide haute performance (HPLC). De plus, les spectres d'absorption peuvent être caractérisés avec un détecteur à barrette de diodes car le noyau lactone des furocoumarines absorbe les rayonnements UVA (320-340 nm).

1.1.2 Distribution dans le règne végétal

Les furocoumarines sont présentes dans quatre grandes familles taxonomiques : les légumineuses (Ex : *Psoralea sp.* et *Coronilla sp.*), les moracées (Ex : *Ficus carica*), les apiacées (Ex : *Ammi majus*, *Pastinaca sativa*, *Apium graveolens*, *Petroselinum crispum*...) et les rutacées (Ex : *Ruta graveolens*, *Citrus lemon*, *Citrus paradisi*, *Citrus bergamia*) (Pathak M.A. *et al.* 1962). La répartition tissulaire en furocoumarines et le type de furocoumarine (linéaire ou angulaire) varient d'une famille à l'autre. Toutes ces familles contiennent des furocoumarines linéaires, alors que l'ensemble des légumineuses et quelques apiacées contiennent également des formes angulaires. Ainsi, l'apparition des formes angulaires serait postérieure aux linéaires dans le mécanisme évolutif.

Les rutacées et surtout les apiacées synthétisent un large éventail de furocoumarines. Le bergaptène, la xanthotoxine et l'isopimpinelline constituent néanmoins les formes principales de furocoumarines rencontrées dans ces deux familles. Alors que les moracées et les légumineuses ne synthétisent principalement que deux types de molécules (psoralène et

bergaptène pour les moracées, psoralène et angélicine pour les légumineuses) (Bourgaud *et al.* 1989).

1.1.3 Rôles écologiques des furocoumarines

Les furocoumarines ont des rôles écologiques variés. Ce sont des phytoalexines qui vont protéger la plante vis-à-vis des microorganismes phytopathogènes (bactéries, champignons). Les furocoumarines sont également des molécules allélopathiques qui sont des inhibiteurs de germination et de croissance vis-à-vis de plantes concurrentes (Baskin *et al.* 1967 ; Vyvyan 2002 ; Hale *et al.* 2004). La protection de la plante contre les herbivores, les insectes et les microorganismes pathogènes est due aux propriétés phototoxiques de ces molécules (McCloud *et al.* 1992 ; Neal and Wu 1994 ; Ojala *et al.* 2000). Berenbaum et Feeny ont émis l'hypothèse en 1981 d'une coévolution entre la présence de furocoumarines angulaires dans certaines plantes et certains insectes (Berenbaum and Feeny 1981). En effet, la résistance aux furocoumarines angulaires et linéaires de certains insectes est liée à la présence d'enzymes de la famille des cytochromes P450 (Wen *et al.* 2003). L'association furanocoumarines linéaires/angulaires dans les tissus végétaux serait moins facilement détoxifiables par les insectes et conférerait un avantage adaptatif aux plantes.

Les furocoumarines confèrent donc aux plantes productrices un avantage vis-à-vis de leurs prédateurs. Toutefois, celui-ci représente un coût métabolique, car la néogénèse de ces molécules nécessite la production d'un certain nombre d'enzymes différentes notamment de type P450 non nécessaires au métabolisme primaire. Pour pallier à ce coût métabolique, deux stratégies ont été développées par les plantes productrices de furocoumarines : développer une allocation préférentielle et mettre en place une induction métabolique.

La première approche consiste en une localisation préférentielle des furocoumarines à la surface des organes les plus exposés à la prédation. On trouve ainsi les concentrations les plus importantes dans les jeunes feuilles, dans les fruits et surtout dans les graines (Pathak *et al.* 1962 ; Zobel and Brown 1990). Cette allocation préférentielle dans les organes reproducteurs et les parties exposées à la prédation a été montrée chez certaines plantes telles

que le panais (*Pastinaca sativa*) et la rue officinale (*Ruta graveolens*) (Brown 1970 ; Milesi *et al.* 2001). Cette optimisation de la localisation de molécules de défense est interprétée comme un phénomène évolutif dans le cadre de la théorie de la « défense optimale » (Nitao and Zangerl 1987).

La seconde approche consiste à induire la synthèse des furocoumarines lors d'épisodes d'agressions et/ou de stress. Ce phénomène d'élicitation permet d'augmenter la synthèse de certains métabolites secondaires chez les ombellifères (Hahlbrock and Schröder 1975). En effet, chez certaines plantes comme le céleri (*Apium graveolens*), la synthèse de furocoumarines est fortement induite en conditions de stress (Chadhary *et al.* 1985).

1.1.4 Propriétés biologiques des furocoumarines

Les furocoumarines sont des hétérocycles aromatiques qui réagissent avec la plupart des macromolécules biologiques de type éthylénique pour former des adduits. A partir de cellules épidermiques de rat traitées avec du 8-méthoxypsoralène (xanthotoxine ou 8-MOP) puis exposées aux UV, Beijersbergen a montré que 17 % du 8-MOP étaient liés aux acides nucléiques (ADN/ARN), 26 % aux lipides, et 57 % aux protéines (Beijersbergen van Henegouwen *et al.* 1989).

1.1.4.1 Réactivités avec les acides nucléiques

Les furocoumarines ont la capacité de réagir avec les acides nucléiques suite à une stimulation photonique pour former un adduit : cette réaction est une photocycloaddition. Cette observation décrite en 1965 sur de l'ADN (Musajo *et al.* 1965) a ensuite été étudiée plus en détail. Le mécanisme réactionnel comprend deux étapes : la furocoumarine s'intercale au sein de l'hélice d'ADN bicaténaire par interaction hydrophobe pour former un complexe à faible énergie ; il y a ensuite activation de l'hétérocycle furocoumarine par une source d'énergie photonique provoquant un pontage covalent avec les carbones 3 et 4 du groupement pyrone et/ou 2' et 3' du cycle furane, et les bases thymine de l'ADN (Figure 2A, B, C). Cette

photocycloaddition peut également se faire sur de l'ARN ou de l'ADN simple brin, mais avec un efficacité moindre qu'avec de l'ADN bicaténaire (Song and Tapley 1979). En effet, l'intercalation de furocoumarine dans une double hélice étant plus stable, la photocycloaddition se fera dans de meilleures conditions.

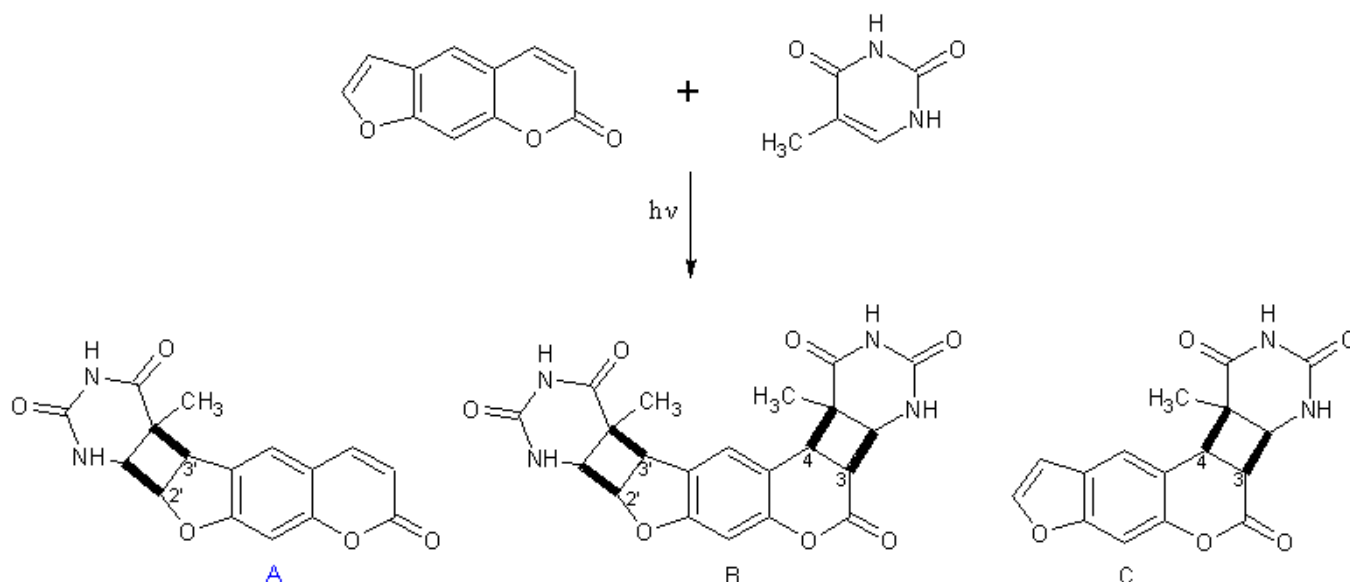


Figure 2 (A, B, C) : Photocycloadditions possibles du psoralène sur une base thymine.

(A) Photoaddition monovalente sur les carbones 2' et 3' du psoralène.

(B) Photoaddition bivalente sur les carbones 3, 4 et 2', 3' du psoralène.

(C) Photoaddition monovalente sur les carbones 3 et 4 du psoralène.

(Song and Tapley 1979)

Lors de l'étape d'activation, les furocoumarines peuvent réaliser un pontage covalent entre deux thymines portées chacune par un des brins de la double hélice d'ADN (Figure 3) (Edelson 1988). Ce pont ainsi formé entre deux thymines va bloquer la réplication et la transcription de l'ADN. Cette propriété explique le caractère antimétabolique et mutagène des furocoumarines (Dardalhon *et al.* 1998).

Grâce à leur capacité à fixer et induire des cassures dans l'ADN, les furocoumarines constituent un outil pratique pour l'analyse des mécanismes de réparation de l'ADN (Brendel *et al.* 2003), ainsi que pour l'étude de la chromatine (Song and Tapley 1979).

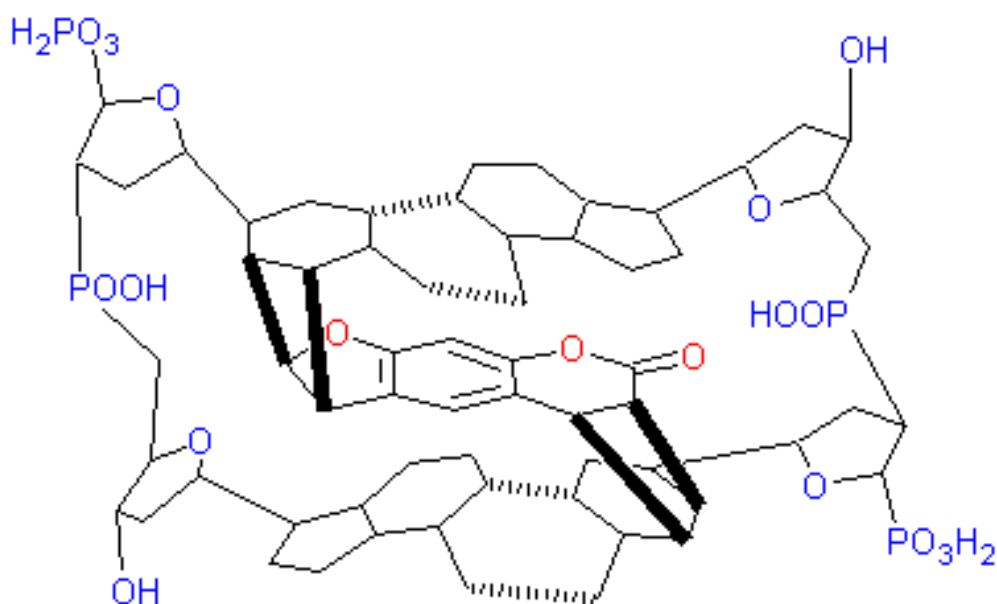


Figure 3 : Photocycloaddition croisée entre une furocoumarine et deux thymines au sein de la double hélice d'ADN. (Edelson 1988)

1.1.4.2 Réactivité avec les lipides

La photocycloaddition des furocoumarines ne concerne pas seulement les acides nucléiques. En effet, les acides gras insaturés (de type éthylénique) ont également la capacité de former des adduits avec les dérivés du psoralène (Figure 4) (Caffieri *et al.* 1989 ; Specht *et al.* 1989). Le mécanisme réactionnel est le même qu'avec les acides nucléiques : les furocoumarines sont d'abord photoactivées avant de former une liaison covalente avec l'acide gras insaturé (Dall'Acqua and Martelli 1991). La photocycloaddition entre les furocoumarines et les lipides insaturés permet d'expliquer certains effets de la P-UVA thérapie comme on le verra plus tard dans la partie concernant la mélanogenèse (Dall'Acqua and Martelli 1991 ; Zarebska *et al.* 2000).

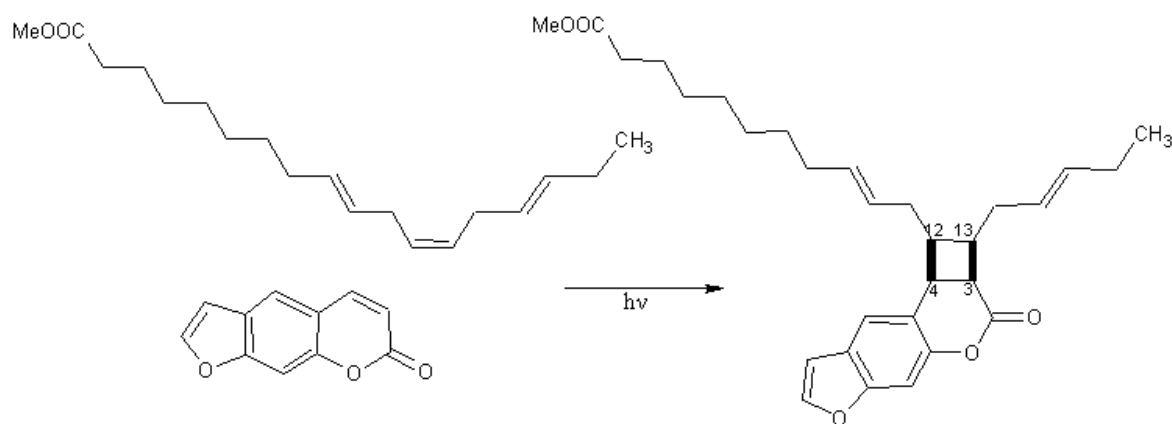


Figure 4 : Photocycloaddition entre le psoralène avec le méthyl ester d'acide linoléique (Dall'Acqua and Martelli 1991)

1.1.4.3 Réactivité avec les protéines

Tout comme les acides nucléiques et les acides gras insaturés, les protéines sont soumises au phénomène de photocycloaddition. Sachant que les furocoumarines sont des hétérocycles aromatiques qui réagissent avec les macromolécules biologiques de type éthylénique, les candidats naturels potentiels formant des adduits seraient donc les acides aminés cycliques (histidine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine) (Bensasson *et al.* 1978 ; Veronese *et al.* 1982). En effet, il a été montré que le psoralène réagissait avec des résidus tyrosine (Sastry 1997). La photoaddition de furocoumarines peut se faire sur tous les types de protéines : enzymes, transporteurs, protéines de structures (Schmitt *et al.* 1994). Plus généralement, la fixation des furocoumarines aux protéines est susceptible d'induire divers effets, tels que l'inactivation enzymatique, la modification de voie de signalisation intracellulaire et l'induction ou la répression de facteurs de transcription.

1.1.4.4 Inhibition enzymatique

Les furocoumarines linéaires sont connues depuis longtemps pour être des inhibiteurs d'enzymes de type cytochrome P450 dans les extraits de foie de mammifères ou d'insectes (Fouin-Fortunet *et al.* 1986 ; Zumwalt and Neal 1993). Ces enzymes étant souvent impliquées

dans la détoxification de xénobiotiques chez ces organismes, les furocoumarines peuvent jouer un rôle synergique vis-à-vis de l'effet d'autres xénobiotiques. Cet effet est notamment observé lors de la prise de médicament associée à une consommation d'aliments contenant des furocoumarines comme le pomelo ou le céleri. Il en résulte une inhibition de certaines enzymes du foie du patient (surtout CYP3A4), ce qui peut conduire à une augmentation non négligeable des molécules médicamenteuses circulantes et donc s'avérer dangereux (Chan *et al.* 1998 ; Ho *et al.* 2001). Cette synergie pourrait être utilisée pour diminuer la posologie de certains médicaments (Fuhr 1998).

1.1.4.5 Photooxydation

Hormis les réactions de photocycloaddition que l'on vient de décrire, les furocoumarines ont la capacité de produire des espèces réactives de l'oxygène (EROs) ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $HO^{\bullet}$) lorsqu'elles sont activées par les UV. Notons que les EROs sont les principaux composés impliqués dans le vieillissement cellulaire. De plus l'irradiation du psoralène par les UVA provoque la formation de dérivés carbonyles hautement toxiques (Marley *et al.* 1995). La formation de ces dérivés toxiques est un mécanisme alternatif important dans le caractère phototoxique des furocoumarines.

1.1.5 Les furocoumarines linéaires en thérapeutique

Depuis l'Antiquité, plusieurs civilisations ont utilisé les furocoumarines pour se soigner. En effet, on trouve dans la pharmacopée traditionnelle indienne et égyptienne des plantes productrices de furocoumarines comme *Psoralea corylifolia* et *Ammi majus* (Scott *et al.* 1976 ; Pathak and Fitzpatrick 1992).

L'association d'une irradiation ultraviolette par UVA avec la prise orale ou l'application percutanée de psoralène ou de furocoumarines est appelée P-UVA thérapie (ou photochimiothérapie). Depuis 1974, cette association est utilisée pour traiter certaines

maladies de peau dont le vitiligo et le psoriasis (Parrish *et al.* 1974 ; Henseler *et al.* 1981 ; Deidra *et al.* 1999). A l'heure actuelle, un seul princeps est utilisé en P-UVA thérapie, la Méladinine® (DCI : Méthoxalène = xanthotoxine = 8-MOP) appartenant à la classe thérapeutique des Méthoxypsoralènes. Les formes galéniques disponibles sont soit des comprimés *per os*, soit des solutions alcooliques utilisées en topique.

L'utilisation des furocoumarines est retrouvée dans le cadre des nouveaux développements dans divers domaines thérapeutiques, comme le traitement symptomatique de multiples scleroses (Pereira *et al.* 2007), la photochimiothérapie de lymphome à cellules T (Plumas *et al.* 2003) et la chimiothérapie de tumeurs résistantes à la polychimiothérapie (Kawase *et al.* 2005).

1.2 Les furocoumarines linéaires: voie de biosynthèse et localisation au sein de la plante

1.2.1 Voie des phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes supérieures dont le précurseur est la phénylalanine, ainsi que la tyrosine chez les monocotylédones. La synthèse des acides aminés aromatiques (Phe, Tyr) est issue de la voie de synthèse du shikimate qui débute par une aldocondensation entre le phosphoénolpyruvate et l'érythrose-4-phosphate (produit intermédiaire du cycle de Calvin) pour former un composé en C7. Ce composé va ensuite se cycliser en un dérivé du cyclohexane et va subir une déshydroxylation suivie d'une réduction pour former le shikimate. Celui-ci va subir une cascade de réactions menant à la synthèse de la phénylalanine (Figure 5).

A partir de la phénylalanine, la voie de biogenèse des phénylpropanoïdes permet la synthèse de dérivés du phénylpropane dont le squelette de base est un composé en C6C3 (Figure 6). La voie des phénylpropanoïdes constitue le point de départ de la synthèse de divers métabolites :

- Les dérivés directs tels que l'acide caféique ou ceux contenus dans les huiles essentielles comme le cinnamate, l'eugénol ou encore l'anéthole.
- Les dérivés estérifiés comme l'acide chlorogénique.
- Les flavonoïdes comme la rutine.
- Les dérivés issus de la lactonisation du 2,4-dihydroxycinnamate : les furocoumarines.
- Les polymères de monolignols qui forment les lignanes et les lignines.

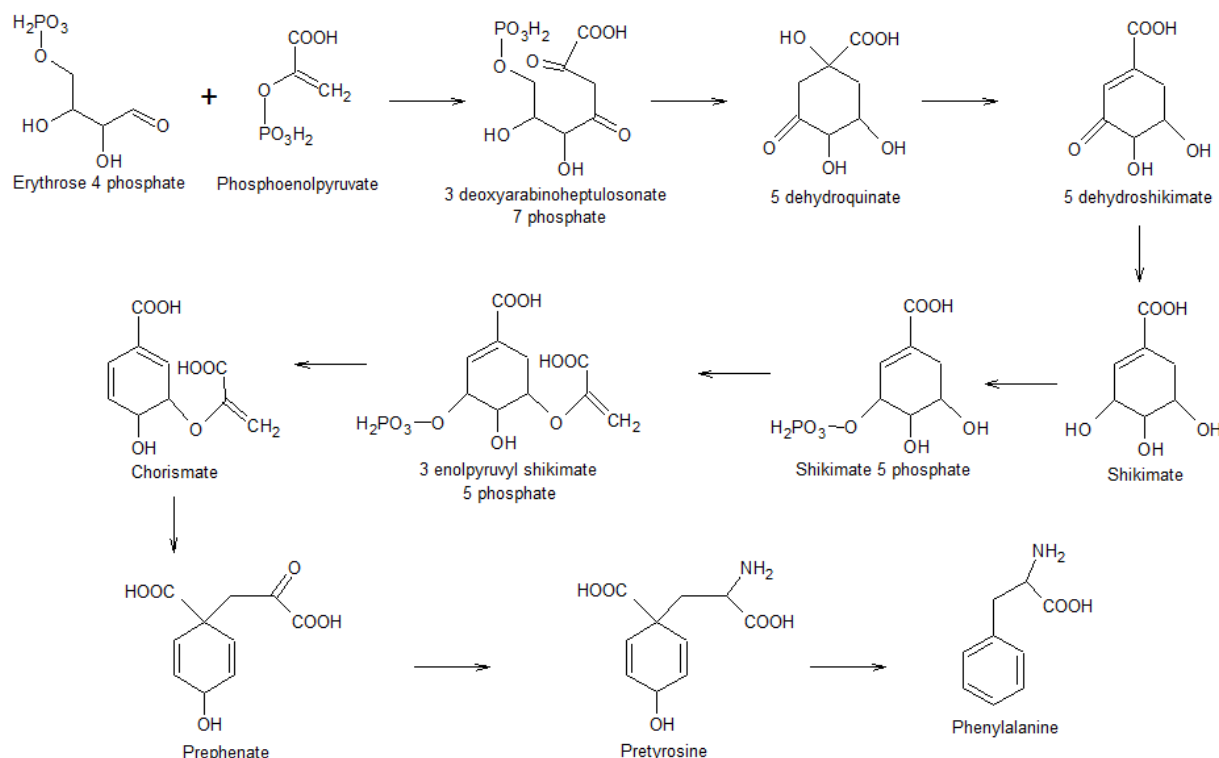


Figure 5 : Représentation de la voie de biosynthèse de la phénylalanine.

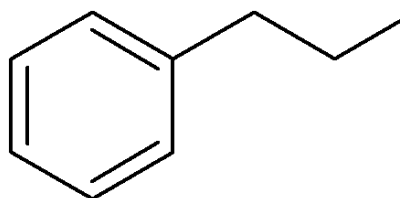


Figure 6 : Squelette de base d'un phénylpropanoïde type.

La conversion de la phénylalanine en acide cinnamique par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) marque l'entrée dans la voie des phénylpropanoïdes (Figure 7).

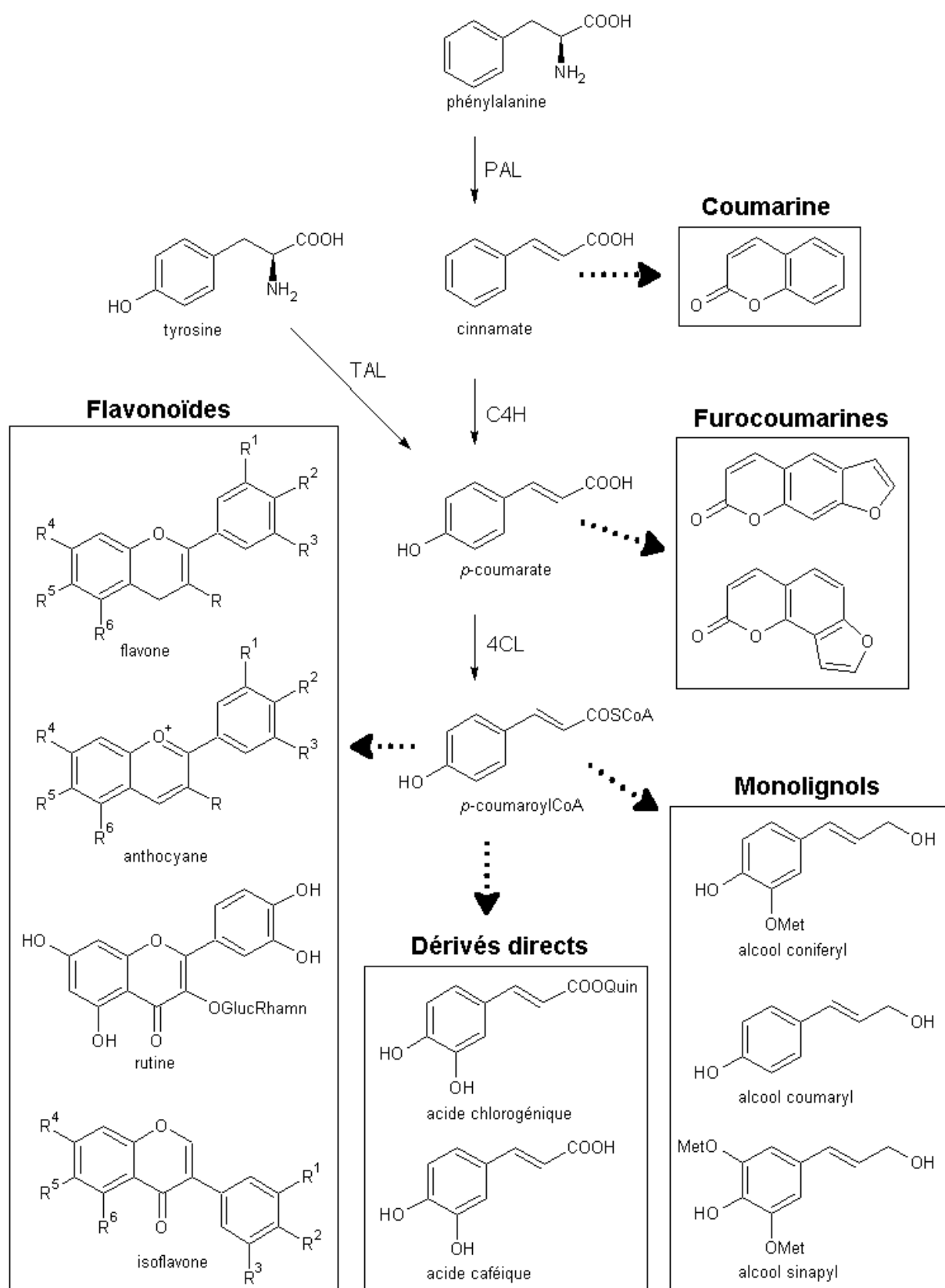


Figure 7 : Représentation partielle de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. PAL : Phénylalanine Amonia-Lyase ; TAL : Tyrosine Amonia-Lyase ; C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase ; 4CL : p-Coumarate CoA Ligase.

La déamination oxydative de la phénylalanine en acide cinnamique est catalysée par la L-phénylalanine amonia-lyase (PAL). La PAL est une enzyme clef à l'embranchement des voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des acides aminés aromatiques. L'acide *p*-coumarique se forme en général par hydroxylation de l'acide cinnamique grâce à la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) qui est une enzyme membranaire du réticulum endoplasmique. Néanmoins, on peut également avoir une déamination oxydative de la tyrosine en acide *p*-coumarique, réaction catalysée par la L-tyrosine amonia-lyase (TAL).

La transformation catalysée par la TAL semble se dérouler surtout chez les *Poaceae*. Une *ortho*-hydroxylation du cinnamate conduit à la voie des coumarines « vraies » (Kindl 1971 ; Gestetner and Conn 1974 ; Czichi and Kindl 1975 ; Kai *et al.* 2008).

L'hydroxylation en position 4 (*para*-hydroxylation) du cinnamate par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) (Russell and Conn 1967 ; Czichi and Kindl 1975) produit le *p*-coumarate qui est un composé central d'où vont diverger trois grandes voies de biosynthèses. La voie commune à toutes les plantes supérieures est celle menant à la synthèse des monomères de lignine. Cette voie débute par une estérification du *p*-coumarate par du CoA, réaction catalysée par la *p*-coumarate : CoA ligase (Endler *et al.* 2008). Le *p*-coumaroyl-CoA est ensuite pris en charge par diverses enzymes pour former les différents monomères de lignines. L'élucidation de cette voie métabolique est pratiquement décrite (Humphreys *et al.* 1999 ; Boudet 2000 ; Humphreys and Chapple 2002). Le *p*-coumaroyl-CoA est également le précurseur de la grande famille des flavonoïdes. Ces molécules sont notamment à l'origine de la couleur des fleurs (Dixon and Steele 1999). La troisième voie dérivant du *p*-coumarate est celle conduisant à la synthèse des furocoumarines.

1.2.2 Biosynthèse des furocoumarines linéaires

La voie de biosynthèse des furocoumarines linéaires (Bourgaud *et al.* 2006) (Figure 8) commence par une étape spécifique à cette voie, une hydroxylation en *meta* de l'hydroxyle du

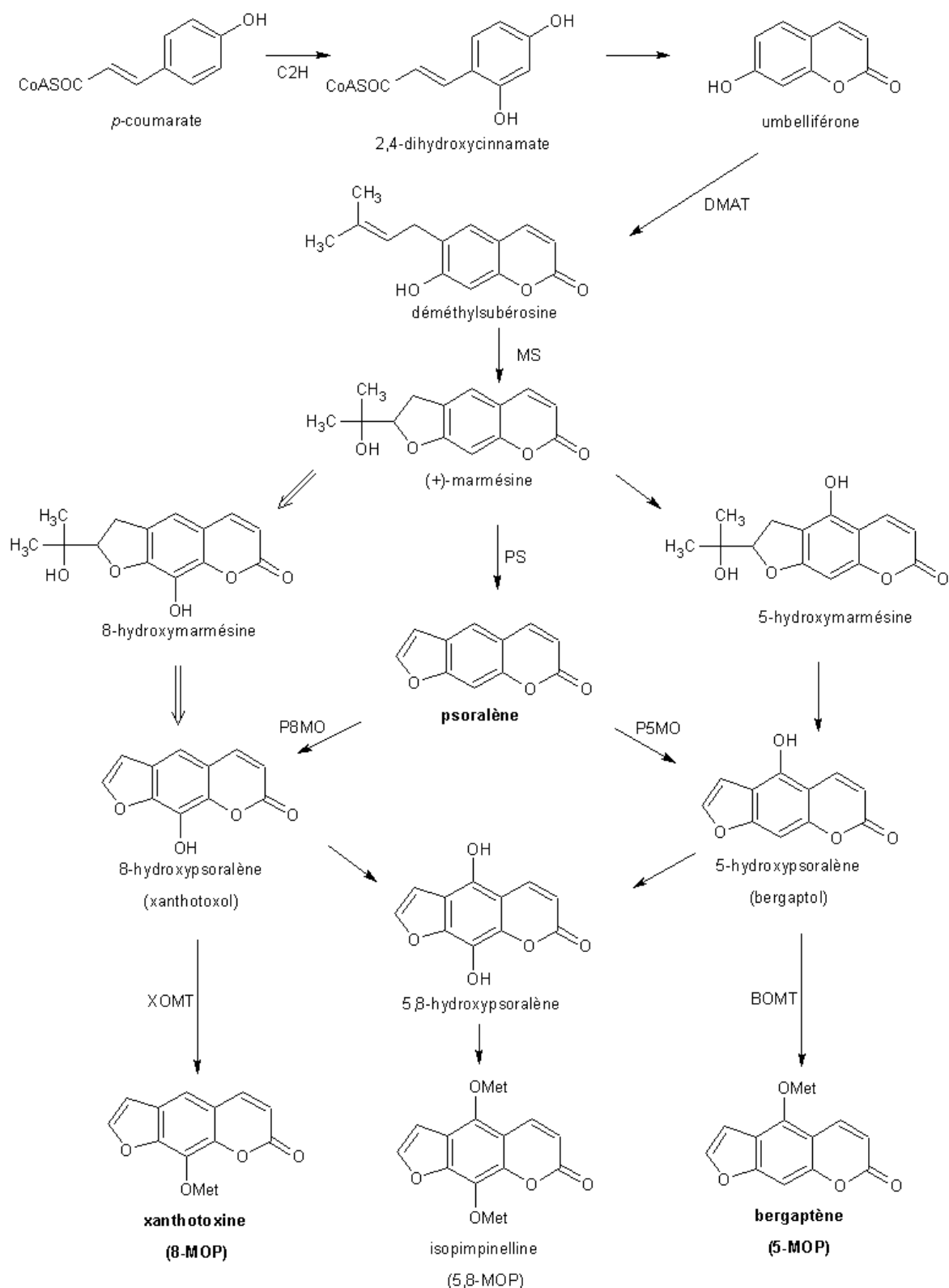


Figure 8: Voie de biosynthèse des furanocoumarines linéaires chez *R. graveolens* L. La voie passant par la formation de la 8-hydroxymarmésine est hypothétique. C2H : Coumaroyl 2-Hydroxylase ; DMAT : DiMéthylAllyl Transférase ; MS : Marmesine Synthase ; PS : Psoralène Synthase ; P5(8)MO : Psoralène 5(8) MonoOxygénase ; X(B)OMT : Xanthotoxol (Bergaptol) O-Méthyl Transférase.

p-coumarate par l'enzyme coumarate 2-hydroxylase (C2H). De manière plus générale, on présumait que les hydroxylations en *ortho* des C6C3 étaient faites par des P450.

Récemment, Kai a montré que l'hydroxylation en *ortho* du feruloyl CoA est réalisée par une enzyme de la famille des 2OGDs (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase) (Kai *et al.* 2008). Il est important de souligner que cette enzyme ne fonctionne qu'avec des esters de CoA.

Le 2,4-dihydroxycinnamate va ensuite se condenser par estérification intramoléculaire (lactonisation) pour former l'umbelliférone. Cette étape ne nécessite l'intervention d'aucune enzyme, car elle est exclusivement photochimique. De plus, cette réaction semblerait se réaliser au niveau de l'appareil chloroplastique (Gestetner and Conn 1974), même si ces seuls résultats restent controversés car ils n'ont pu être confirmés (Brown and Zobel 1990).

Ensuite, l'umbelliférone est prénylée par l'ajout d'une unité isoprène, le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP). Le groupement prényl peut être ajouté sur les carbones C6 ou C8 de l'umbelliférone, orientant la synthèse respectivement vers les furocoumarines linéaires ou angulaires. L'enzyme catalysant cette réaction est la diméthylallyl transférase (aussi appelée diméthylallylpyrophosphatase). Des expériences de marquage isotopique réalisées sur des feuilles de céleri avec du déoxy-D-xylulose deutéré montre que le prényl ajouté sur l'umbelliférone est issu de la voie chloroplastique de Rohmer (Stanjek *et al.* 1997) et non de la voie dépendante du mévalonate (Stanjek *et al.* 1999). Actuellement, seule la diméthylallylpyrophosphatase catalysant l'ajout du prényl en C6 pour former la déméthylsubérosine (DMS) a été caractérisée biochimiquement à partir de cellules de *Ruta graveolens* (Ellis and Brown 1974).

La déméthylsubérosine est convertie en (+)-marmésine par cyclisation intramoléculaire entre l'hydroxyl en C7 et la fonction alcène du prényl en C6 par la marmésine synthase. Cette étape est catalysée par un cytochrome P450 localisé dans le réticulum endoplasmique chez *Ammi majus* (Hamerski and Matern 1988).

La (+)-marmésine est ensuite métabolisée en psoralène par libération d'une molécule d'acétone. Là aussi, cette étape est catalysée par un cytochrome P450 localisé dans le réticulum endoplasmique chez *Ammi majus* (Hamerski and Matern 1988). L'enzyme réalisant la conversion de la (+)-marmésine en psoralène, i.e la Psoralène Synthase, a été clonée par la suite à partir de cellules élicitées d'*Ammi majus* (Larbat *et al.* 2007).

Le psoralène est hydroxylé en position 5 ou 8 donnant respectivement le bergaptol ou le xanthotoxol. Jusqu'à présent, seule l'activité de la psoralène 5-monooxygénase, un autre P450, a pu être caractérisée à partir de cellules élicitées d'*Ammi majus* (Hamerski and Matern 1988).

Le bergaptol et le xanthotoxol sont ensuite *O*-méthylés pour donner le bergaptène (5-MOP) et la xanthotoxine (8-MOP). Les bergaptol et xanthotoxol *O*-méthyl transférases ont été purifiées à partir de cellules de *Ruta graveolens* et isolées chez le persil (Thompson *et al.* 1978 ; Sharma *et al.* 1979 ; Hauffe *et al.* 1986) et une séquence codante de la bergaptol *O*-méthyltransférase a été isolée à partir de cellules d'*Ammi majus* (Hehmann *et al.* 2004).

Chez *Ficus carica* et *Ruta graveolens*, la biosynthèse du bergaptène et de la xanthotoxine prend aussi une voie parallèle passant par une hydroxylation en 5 ou 8 de la (+)-marmésine convertie en 5 ou 8-hydroxypsoralène qui est ensuite *O*-méthylée (Caporale *et al.* 1981 ; Innocenti *et al.* 1981). Le bergaptol et le xanthotoxol peuvent être respectivement hydroxylés en position 8 et 5 donnant le 5,8-dihydroxypsoralène. Dans les racines de *Ruta graveolens*, le 5,8-dihydroxypsoralène est le précurseur physiologique majeur de l'isopimpineline (5,8-diméthoxypsoralène = 5,8-MOP) (Innocenti *et al.* 1983).

1.2.3 Régulations de la voie de biosynthèse

Rentabiliser l'énergie est la condition *sine qua non* au maintien et à la pérennisation de toute vie. Pour cela, la plante cherche à optimiser ses ressources en régulant à chaque niveau les

acteurs indispensables à la production d'un composé. La production de furocoumarines n'échappe pas à cette règle.

1.2.3.1 Elicitations de la biosynthèse

Dans les cultures cellulaires d'*Ammi majus*, la teneur en furocoumarines augmente suite à l'élicitation par *Phytophthora megasperma f.sp. glycinea* (Hamerski and Matern 1988).

Chez *Apium graveolens* L. la teneur en furocoumarines est sensible à la pollution atmosphérique (Derks *et al.* 1990) et augmente durant le stockage des céleris (Chadhary *et al.* 1985). Chez *Pastinaca sativa* L. la teneur en furocoumarines est variable selon la teneur en nutriments (N, P, K) du sol (Zangerl and Berenbaum 1987). Dans le cas de cultures cellulaires de *Petroselinum crispum*, les furocoumarines et des pyranocoumarines ne sont produites qu'en présence d'un pathogène fongique (Tietjen *et al.* 1983), de plus l'augmentation de la synthèse est liée à une augmentation des activités enzymatiques de la voie des furocoumarines (Hauffe *et al.* 1986).

Dans les cultures cellulaires de *Ruta graveolens*, la production des furocoumarines est constitutive et variable selon les chimiotypes et les souches cellulaires. L'élicitabilité de ces souches est d'autant plus élevée que la teneur en furocoumarines est faible. Les souches fortement productrices de façon constitutive ne répondent presque plus à l'élicitation (Milési 2001).

1.2.3.2 Régulations au niveau transcriptionnel

L'élicitation d'une voie biosynthèse se traduit souvent par une régulation transcriptionnelle du génome. Ainsi, une élicitation par la lumière, des blessures ou des infections induit l'expression des gènes de la voie du shikimate (Weaver and Herrmann 1997). La présence de plusieurs isoformes des enzymes impliquées reflète une certaine spécialisation face aux différents types d'élicitations. Chez plusieurs types de plantes, l'infection par un pathogène n'induit qu'une seule des deux isoformes de la DAHPS (3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate) et de la chorismate synthase.

C'est suite à des élicitations que les séquences de certaines enzymes appartenant à la voie de biosynthèse des furocoumarines ont pu être clonées. On a pu montrer que l'élicitation d'*Ammi majus* conduit à l'expression de la psoralène 5-monooxygénase (Hamerski and Matern 1988), de la marmésine synthase, de la psoralène synthase (Hamerski and Matern 1988 ; Larbat *et al.* 2007), ainsi que de la bergaptol *o*-méthyltransférase (Hehmann *et al.* 2004).

Plusieurs éléments dans la séquence du promoteur de la C4H seraient impliqués dans la régulation par la lumière, la blessure et l'élicitation par des pathogènes (Bell-Lelong *et al.* 1997b). Le niveau de transcription de la C4H est intense dans les tissus produisant de la lignine (tige, nervures), des métabolites secondaires (cotylédons et siliques chez *Arabidopsis thaliana*) ainsi que dans les racines. La transcription du gène de la C4H est réprimée par les facteurs de transcription de type R2R3 MYB dont le niveau d'expression diminue après exposition aux UV. La levée de cette inhibition se traduit par une augmentation de la transcription de la C4H et par une accumulation de molécules de types phénylpropanoïdes en aval (Jin *et al.* 2000). Les facteurs de transcriptions de type R2R3 MYB sont également impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (Boudet 2007). Une construction avec le promoteur de la C4H de *Populus tomentosa* mis en amont du gène codant pour la glucuronidase (GUS) introduit dans des plants de tabac a montré que l'expression du gène en aval de ce promoteur est temporairement et spatialement spécifique (Zhao *et al.* 2005).

1.2.3.3 Régulations post-transcriptionnelles et rétrocontrôles enzymatiques

Chez *Arabidopsis thaliana* et *Solanum lycopersicum*, des mécanismes de rétrocontrôle ont été mis en évidence au niveau de la voie menant du shikimate au chorismate. Une isoforme chloroplastique de la chorismate mutase, CM1, est sensible à la rétroinhibition par le tryptophane et la tyrosine, à la différence de l'isoforme cytosolique, CM2. Cette CM2 ne semble pas participer à la synthèse des acides aminés (Coruzzi and Last 2000), et pourrait être impliquée dans la synthèse de métabolites secondaires. Un autre exemple de la spécificité fonctionnelle des isoformes de certaines enzymes est celle de l'antranilate synthase de *Ruta*

graveolens. Une isoforme insensible au tryptophane est spécifique de la synthèse d'alcaloïdes dérivés de l'anthranilate (Bohlmann *et al.* 1996).

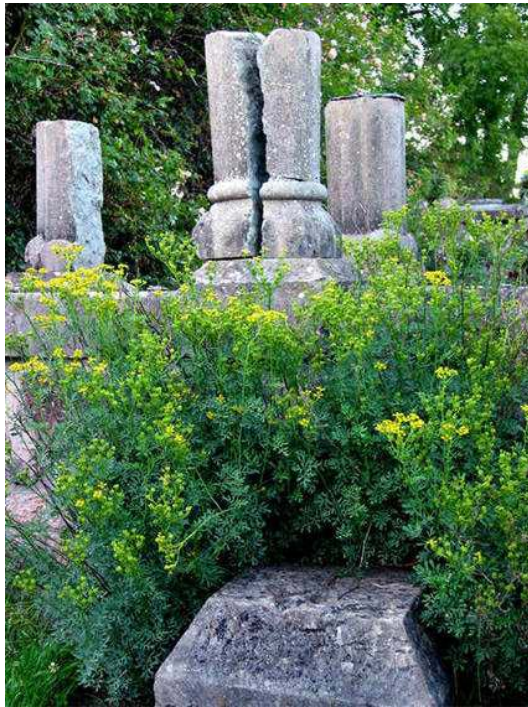
Un des niveaux de régulation de la PAL se fait au travers de la phosphorylation de l'enzyme par une kinase (Allwood *et al.* 1999). Un autre mécanisme consiste en un feedback négatif du cinnamate sur la PAL qui provoque une inactivation irréversible (Bolwell *et al.* 1994).

Une C4H de *Phaseolus vulgaris* présente un site potentiel de modifications post-traductionnelles (glycosylations) ; l'intérêt de cette glycosilation est inconnu. L'efficacité de l'épissage de ce même gène semble varier en fonction des conditions de cultures cellulaires (Nedelkina *et al.* 1999).

2 *Ruta graveolens* L.

2.1 Description botanique

Ruta graveolens L appelée communément rue fétide, rue des jardins, herbe de grâce, rue officinale, ou rue commune est un arbrisseau de la famille des *Rutaceae*, du genre *Ruta* (Figure 9 a,b). C'est une plante méditerranéenne semi arbustive, d'un mètre de haut environ, très ramifiée et ligneuse à la base. Ses feuilles (figure 10) d'un vert terne, semi persistantes, sont alternes, pennatiséquées (souvent trilobées) et de consistance un peu charnue. La floraison s'étend de mai à août. Ses fleurs (figure 10), regroupées en corymbe, sont composées de 4 à 5 pétales jaunes verdâtres soudés à la base, du même nombre de sépales et de 8-10 étamines. La plante est hermaphrodite et entomogame. Les fruits sont des capsules déhiscentes libérant à maturité de petites graines noirâtres. Le mode de dissémination des graines est barochore.



(a)



(b)

**Figure 9 (a, b) : (a) Arbrisseau de *Ruta graveolens* L à l'état sauvage.
(b) planche botanique de rue (<http://botanical.com/>).**



Figure 10 : Photo de feuille et de fleurs de *Ruta graveolens* L

Ruta graveolens se caractérise par une odeur forte, acre et pénétrante émise par les huiles contenues dans les poches schizolysogènes à la surface des feuilles. *Ruta* vient du grec 'rhyté' qui signifie sauver, prévenir, ou de 'reô' qui signifie qui coule faisant certainement référence à ses vertus emménagogues ; *graveolens* vient du latin 'gravis' qui signifie fort et du verbe 'olere' qui veut dire sentir, donc odeur forte et désagréable.

La rue est une plante originaire du sud est de l'Europe. Elle est largement naturalisée dans toute l'Europe et en Afrique du nord. Elle nécessite un sol léger, sec, calcaire et bien exposé au soleil. La multiplication se fait par semi ou bouturage.

2.2 Localisation et stockage des furocoumarines

La localisation tissulaire et cellulaire des furocoumarines varie selon les espèces. Etant des molécules toxiques du fait de leurs propriétés biologiques et chimiques, les furocoumarines sont stockées essentiellement dans la vacuole des cellules sous forme glycosylée inoffensive. La proportion de génines sous forme glycosylée varie en fonction des espèces.

Chez *Ruta graveolens*, la localisation physiologique des furocoumarines est préférentiellement dans les fruits (1,5% de la matière sèche du péricarpe). La répartition globale dans les feuilles est de 0,36% de la matière sèche avec une production très marquée dans les nervures (0,71% de la matière sèche). Les tiges quant à elles en contiennent des teneurs inférieures (0,2% de la matière sèche) (Milési 2001 ; Milesi *et al.* 2001). Chez la rue, on en trouve également à la surface des feuilles associées à la cuticule (Zobel and Brown 1988).

Si l'on regarde la répartition histologique des 3 principales furocoumarines linéaires, les quantités les plus élevées sont présentes dans l'épiderme, des quantités moindres dans les cellules du parenchyme, et seulement des traces dans les poches schizolysogènes. On en trouve également en faible quantité à la surface de la cuticule. La localisation d'une partie

substantielle de ces furanocoumarines linéaires à la surface est un facteur dans la propension de la rue officinale à l'induction de photophyto dermatite (Zobel and Brown 1989).

Au niveau cytologique, les plantes produisant des furocoumarines ont mis en œuvre des mécanismes de stockage pour éviter une auto-intoxication, en raison de la forte réactivité des furocoumarines avec les différents constituants cellulaires. Pour diminuer leur réactivité, les molécules sont glycosylées par des glucosyl-transférases présentes dans le compartiment cytosolique, puis sont stockées dans la vacuole. Ces hétérosides peuvent être convertis en formes libres par l'action de β -glycosidases localisées dans le cytosol. Lors d'une blessure physique, la cellule est décompartimentée, les furocoumarines glycosylées deviennent alors accessibles aux β -glycosydases et sont converties en génines libres et toxiques. Cette stratégie de défense constitue ainsi une réponse rapide et locale à une agression mécanique. La proportion de glycosylation est variable selon les plantes. Ainsi, chez *Psoralea cinerea*, la totalité des furocoumarines est glycosylée (Nguyen 1992), alors que dans le cas de *Ruta graveolens*, seulement un tiers l'est (Zobel and Brown 1990). Les furocoumarines peuvent également être stockées sous forme libre à l'extérieur de la cellule, dans les espaces intercellulaires ou à la surface des feuilles. Par ailleurs, des études d'immunohistolocalisation ont montré que le psoralène et le 8-MOP sont étroitement associés au xylème chez *Ruta graveolens* (Massot 2001b). Cette localisation favoriserait une défense systémique en réponse à une agression.

2.3 Intérêt du modèle *Ruta graveolens* pour la production de furocoumarines

Les plantes appartenant au genre *Ruta* produisent de nombreux métabolites secondaires dont les furanocoumarines. On y trouve également des alcaloïdes acridones et des furoquinolines distribués exclusivement dans la famille des *Rutaceae*. Elles contiennent entre 4 et 17 mg de furanocoumarines par gramme de matière sèche. Ces concentrations sont plus importantes que celles trouvées dans d'autres familles connues qui produisent les mêmes composés (*Moraceae*, *Apiacea*, et *Fabaceae*). Les dérivés du psoralène sont surtout stockés au niveau des fruits, et dans une moindre mesure au niveau des feuilles. Les furocoumarines

rencontrées principalement au niveau des feuilles sont le psoralène, le bergaptène (5-MOP) et la xanthotoxine (8-MOP). Des investigations menées sur quatre plantes du genre *Ruta* (*Ruta graveolens*, *Ruta chalepensis*, *Ruta angustifolia*, et *Ruta montana*) ont montré que *R. graveolens* est le meilleur candidat pour la production de furanocoumarines, en considérant le niveau de production et la résistance au froid (Milesi *et al.* 2001).

2.3.1 Production en champ

La production de furocoumarines par *Ruta graveolens* en plein champ nécessite la mise au point de techniques culturales permettant de fournir du matériel végétal à teneur élevée en furocoumarines. Les travaux de Poutaraud (Poutaraud *et al.* 2000) ont montré que la teneur en furanocoumarines est fonction de la proportion de feuilles et de fruits de la plante (Tableau 1). Par contre, elle est indépendante de sa biomasse, ceci à un âge donné.

	Rendement cumulatif moyen (tonnes de matière sèche /ha)	Concentration moyenne de furocoumarines (% m/m)	Rendement en furocoumarines (kg/ha)
Une coupe à la fin de la 2 nd année de croissance, lors de la mise à fruit.	5,3	0,4	20,8
Une coupe la 1 ^{ère} année de croissance et deux coupes tardives la 2 ^{ème} année.	4,7	0,41	19,3
Une coupe la 1 ^{ère} année de croissance et deux coupes la 2 ^{ème} année.	3,5	0,46	16,1
Une coupe la 1 ^{ère} année de croissance et trois coupes la 2 ^{ème} année.	3,3	0,51	16,8

Tableau 1 : Variations de la teneur et du rendement en furocoumarines chez *Ruta graveolens* en fonction de la technique culturale utilisée (Poutaraud *et al.* 2000).

Les parties aériennes récoltées 3 mois après le semis, et les fruits récoltés la seconde année possèdent la même teneur forte en furanocoumarines (0,9% de la matière sèche).

Cependant, le rendement en matière sèche produit est faible (respectivement 0,2 et 1,6 tonnes par hectare). La récolte des parties aériennes de deuxième année donne un rendement supérieur (environ 5 tonnes par hectare) mais de moindre qualité (0,4%). Un système de coupes successives (trois coupes en seconde année) permet d'échelonner les récoltes. Le matériel végétal contient alors 0,51% de furanocoumarines pour 3,3 tonnes de matière sèche totale récoltée. La proportion entre les différentes furanocoumarines varie suivant l'année de récolte et l'organe.

Ces travaux ont été considérablement complétés par la thèse de Milési (Milési 2001). Il existe un effet terroir : un sol limono-argileux riche permet une production 3,7 fois plus élevée en furocoumarines par plante (1109 mg) par rapport à un sol sableux pauvre (302 mg par plante). De plus, Milési a montré que la densité n'avait pas d'effet sur le rendement surfacique en furocoumarines et sur la productivité annuelle moyenne. Pour une année donnée, les plantes récoltées au mois de juillet (stade fructification) produisent 7 fois plus de furocoumarines que les plantes récoltées en avril (stade végétatif), et 2 fois plus que celles récoltées en octobre (après la chute des fruits).

2.3.2 Cultures *in vitro*

La production de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique à haute valeur ajoutée par des techniques de cultures *in vitro* (Figure 11) peut constituer un moyen plus intéressant que la culture des plantes en champ. En effet cette production peut être plus rapide sur un laps de temps donné et de plus la qualité des produits est indépendante des conditions climatiques.

En raison de leur intérêt thérapeutique, la possibilité d'une production de furocoumarines par des cultures *in vitro* de *Ruta graveolens* a été étudiée. Les premières cultures cellulaires de rue remontent à la fin des années 60 (Reinhard *et al.* 1968). Dans les années 90, ce mode de culture a été évalué pour sa potentialité à produire des furocoumarines d'une manière industrielle (Massot *et al.* 2000 ; Massot 2001a). Cependant, tout comme des essais similaires avec d'autres plantes médicinales, le coût élevé et les niveaux de production

trop faibles des cultures cellulaires rendent ce système moins intéressant que des cultures en champ.



Figure 11 : Chambre de culture.

Les cultures cellulaires de *Ruta graveolens* sont élicitables pour la synthèse des furocoumarines dans certaines conditions par des extraits du champignon *Verticilium sp.*. L'importance de la réponse est néanmoins inversement proportionnel au niveau de synthèse basal. En effet, plus la production basale en furocoumarine est faible, plus l'augmentation de cette production suite à une élicitation sera élevée (Zobel and Brown 1993 ; Milesi *et al.* 2000).

Les cultures *in vitro* sur du matériel végétal élicitable constituent néanmoins un outil de choix pour l'étude des voies de biosynthèse en fournissant un matériel homogène en quantité suffisante pour l'isolement d'enzymes et la caractérisation de gènes d'intérêt. En effet, cette technique a permis d'isoler ou caractériser à partir de cultures cellulaires de *Ruta graveolens*, d'*Ammi majus* ou de *Petroselinum crispum*, certaines des enzymes de la voie de biosynthèse des furocoumarines (Ellis and Brown 1974 ; Hauffe *et al.* 1986 ; Hamerski and Matern 1988 ; Larbat *et al.* 2007).

La culture *in vitro* est une technique permettant de régénérer une plante entière à partir de cellules ou de tissus végétaux. Elle permet de garder des plants stériles, exempts de virus et autres infections en plus de pouvoir produire rapidement une large quantité de plantules. Elle est utilisée pour la création de nouvelles plantes telles que des plantes génétiquement modifiées, la multiplication de plantes commerciales produisant peu ou pas de graines, ou encore la conservation et multiplication d'espèce rares. Un des avantages de la micropropagation est que l'on peut avoir des centaines de plantes dans un environnement restreint et confiné avec une température, humidité et luminosité contrôlées.

3 Les cytochromes P450

3.1 Cytochromes P450 : généralités

3.1.1 Définition

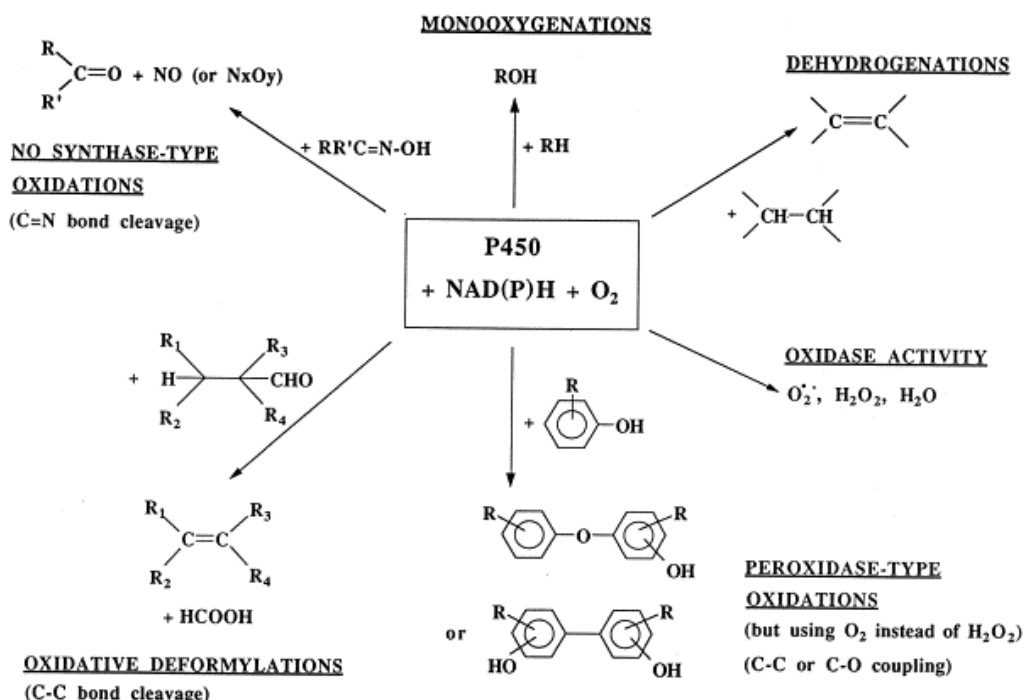


Figure 12 : Exemples de diversité réactionnelle de P450 (Mansuy 1998).

Les cytochromes P450 ou P450 sont une superfamille d'hémoprotéines multigéniques présentant des activités enzymatiques très variées. Leur nom est dû à : P pour pigment, et 450 est dû à la capacité de ces hémoprotéines à absorber à 450nm lorsqu'elles fixent une molécule de monoxyde de carbone en présence de dithionite sodium (Klingenberg 1958 ; Omura and Sato 1964).

On trouve les cytochromes P450 dans la plupart des êtres vivants : archaebactéries, eubactéries, plantes et animaux. Les P450 ont des activités enzymatiques très variées telles que par exemple les oxygénations, N-oxydations, réduction, alkylation, déalkylation, désamination oxydatives (Figure 12).

3.1.2 Classification

Les P450 se répartissent en 4 classes en fonction du mode de transfert des électrons (Degtyarenko and Archakov 1993 ; Werck-Reichhart and Feyereisen 2000). Les P450 de type I fonctionnent avec deux partenaires redox, une NAD(P)H réductase à FAD associée à une ferredoxine fer-soufre. Les P450 de classe I sont représentés essentiellement chez les bactéries sous forme soluble et chez les eucaryotes associés à la membrane interne des mitochondries.

Les P450 de type II fonctionnent avec un seul partenaire redox, une NAD(P)H réductase à FAD et FMN associée au réticulum endoplasmique par son extrémité N-terminale. C'est dans cette classe que l'on retrouve la majorité des P450 eucaryotes impliqués dans le catabolisme des xénobiotiques, les réactions de biosynthèse des stéroïdes ainsi que des métabolites secondaires aromatiques, et bien d'autres. Quelques P450 de classe II sont également présents chez les bactéries sous formes solubles et possèdent les deux parties fonctionnelles sur la même chaîne polypeptidique (partie héminique et flavinique).

Les P450 de type III sont autosuffisants, i.e fonctionnant sans O₂ ni apport externe d'électrons. Ces enzymes exclusivement eucaryotes sont impliquées dans la synthèse de molécules signales (Hughes *et al.* 2006) dont l'acide jasmonique chez les plantes (Tijet and Brash 2002).

Les P450 de type IV ne sont pour l'instant représentés que par la Nitric Oxide Reductase (P450nor) de *Fusarium oxysporum*. Cette enzyme responsable de la réduction du NO en N₂O, utilise directement le NADH comme source d'électrons (Daiber *et al.* 2005 ; Tsukamoto *et al.* 2005).

3.1.3 Nomenclature

La nomenclature des P450 est basée sur la comparaison de séquences peptidiques. Les P450 sont nommés à partir de la racine CYP (pour **CY**tochrome **P**450) suivi d'un chiffre pour la famille, une lettre désignant la sous famille, et un nombre désignant l'ordre chronologique de la découverte des gènes. Lorsque deux P450 présentent au moins 40% d'homologie de séquence, ils appartiennent à la même famille. Au delà de 55% d'homologie, ils appartiennent à la même sous famille. Les séquences identiques à plus de 97 % sont considérées comme variants alléliques.

Une base de données regroupant la majorité des P450 a été établie par le professeur David Nelson, et adoptée par la communauté scientifique. Elle permet un accès rapide aux données de tous les P450 clonés et/ou caractérisés, et est disponible à l'adresse internet suivante : <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>. Les P450 y sont classés en famille et sous famille en se basant sur l'identité des séquences protéiques. Les familles de P450 de plantes sont numérotées de 71 à 99 et de 701 à 772 pour l'instant, soit 99 familles. 20 % de ces familles ne sont constituées seulement que d'un ou deux gènes. En 2006, environ 6000 gènes de P450 avaient été clonés, dont 3387 issus de plantes. (Données du 9th International Symposium on Cytochrome P450, Nice, France).

Vu la multitude de nouveaux P450 isolés, les familles proches sont depuis peu réunies en clans en se basant sur les arbres phylogénétiques réalisés récemment. Ces clans pourraient rassembler les familles de P450 divergeant d'un gène ancestral commun (Nelson 1999). Le clan est désigné par le plus petit numéro de la famille représentée. Par exemple, le clan 71

regroupe les CYPs 71, 73, 78, 98, 701, et 703, et le clan 85 regroupe les CYPs 85, 88, 90. (Nelson 2006)

3.1.4 Structure

Quelque soit le type de P450 eucaryotes, l'architecture globale des enzymes est conservée. Ces protéines sont composées d'une majorité d'hélices α (annotées de A à L) et de quelques feuillets β s'associant en deux domaines globulaires α et β . L'ancre membranaire présente sur les P450 eucaryotes est une hélice hydrophobe composée d'une vingtaine de résidus à l'extrémité N-terminale suivis de quelques résidus basiques qui la délimitent. Ils ont également une séquence consensus riche en proline (P-P-G-P-X-P-X-P) qui induit un coude permettant au P450 de s'accoler à la membrane (Kemper 2004). L'hème est situé au cœur de l'enzyme dans un environnement hydrophobe entre les hélices L et I (Hasemann *et al.* 1995). L'atome de fer forme une liaison thio-ester avec une cystéine de la séquence consensus F-X-X-G-X-R-X-C-X-G en amont de l'hélice L. L'hélice I, qui compose une partie du site actif, contient une autre séquence consensus (A/G-G-X-D/E-T-T/S) impliquée dans l'activation de l'oxygène. Les régions SRS (Substrate Recognition Site) permettent l'entrée et le positionnement du substrat à proximité de l'hème (Figure 13).

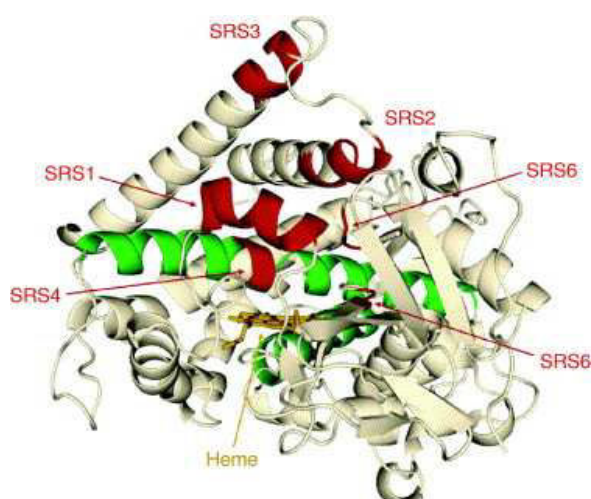


Figure 13 : Modèle d'une structure tertiaire de P450 monooxygénases. La protoporphyrine IX (hème) est en orange, les sites de reconnaissance du substrat (SRS1–SRS6) sont en rouge et les hélices I et L coordonnées à l'hème sont en vert (Urlacher and Eiben 2006).

Actuellement, seulement 27 structures uniques de cytochromes P450 sont disponibles sur NCBI Molecular Modeling Database (MMDB, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>) ou sur Brookhaven Protein Database (PDB, <http://www.rcsb.org>), mais une seule est disponible pour un P450 végétal (Lee *et al.* 2008).

3.1.5 Relation structure activité

3.1.5.1 Cycle catalytique et pouvoir réducteur des P450 monooxygénases de type II

Ce sont des enzymes membranaires toujours associées à une P450 NAD(P)H réductase. Le site actif d'un P450 est constitué d'une partie hémique de type protoporphyrine IX contenant un atome de fer. Cet atome de fer est hexacoordonné : il forme quatre liaisons covalentes avec quatre atomes d'azote du noyau tétrapyrrolique, une cinquième liaison covalente avec un atome de soufre d'un résidu cystéine très conservée dans la partie C-terminale de l'apoprotéine, et une sixième coordinance avec une molécule d'eau présente dans le site actif.

A l'état "normal", l'enzyme est ferrique (Fe^{3+}) bas spin (I) (Figure 14). La fixation de substrat provoque un changement de conformation de la protéine conduisant à une dissymétrie autour de l'atome de fer, se traduisant par un déplacement de l'atome de fer hors du plan de l'hème. Celui-ci passe alors de l'état bas spin vers un état de haut spin. L'atome de fer est alors pentacoordonné (II). Le potentiel redox est suffisamment bas pour que l'enzyme puisse être réduite par un électron. On obtient donc la forme ferreuse (Fe^{2+}) (III). Une molécule de dioxygène peut alors venir prendre la sixième coordinance du fer pour donner un intermédiaire $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2$ (IV). C'est aussi sous cette forme qu'une molécule de monoxyde de carbone peut venir prendre la sixième coordinance du fer (V) et ainsi inhiber l'enzyme. Le complexe oxygéné peut ensuite être réduit par un deuxième électron en complexe peroxyferrique (VI). C'est cette réaction qui initie l'étape catalytique et l'activation de l'oxygène. L'apport de ce deuxième électron est spécifiquement fait par la P450 NAD(P)H réductase. L'apport de deux protons aboutit à la formation d'un complexe ferryl-oxo et d'une

molécule d'eau (VII). C'est à partir de ce complexe ferryl-oxo que l'oxygène est transféré au substrat. Ensuite, après libération du produit, on retrouve l'enzyme libre, ferrique, bas spin, de départ (I).

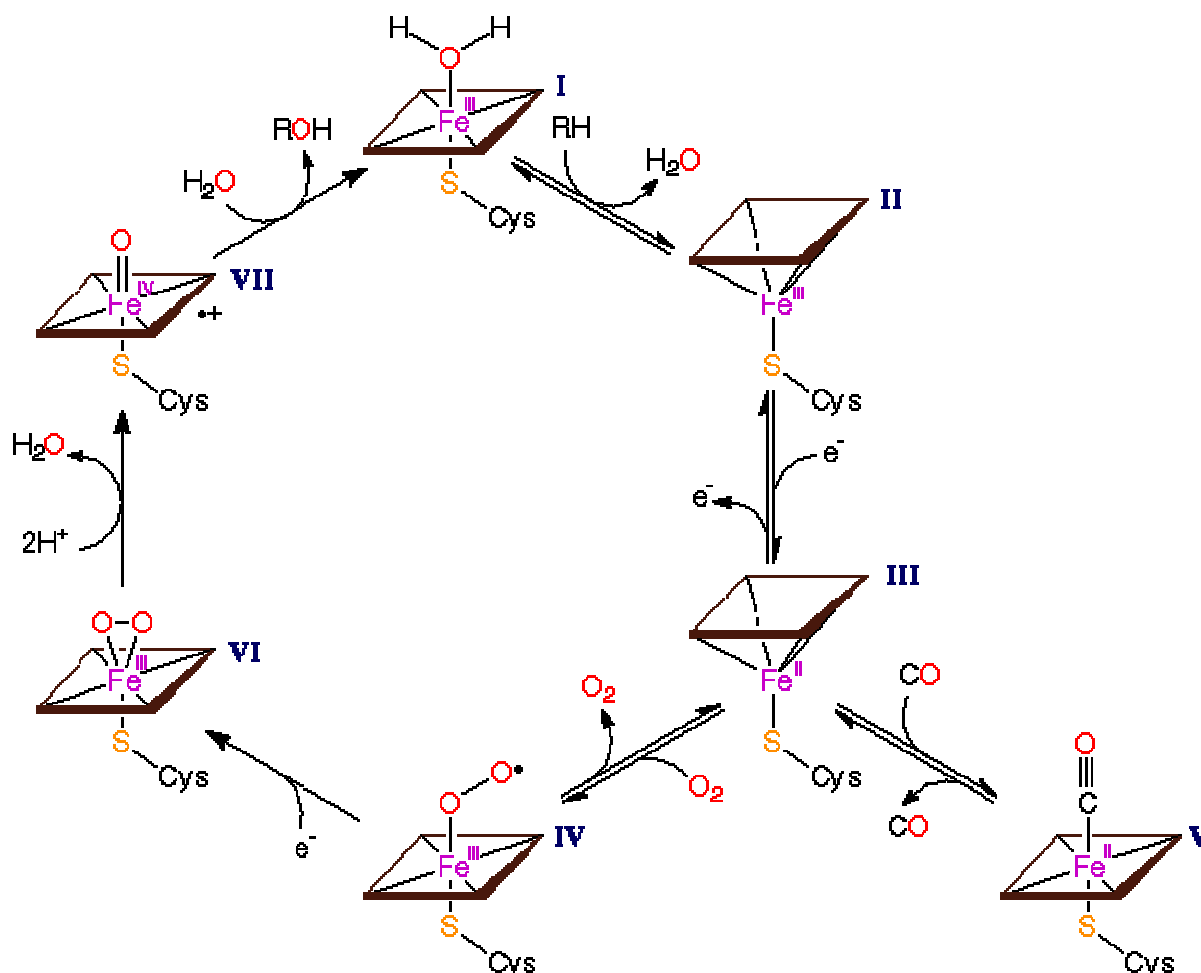


Figure 14 : Cycle catalytique d'un P450 monooxygénase.

(<http://metallo.scripps.edu/PROMISE/P450.html>)

3.1.5.2 Inactivation autocatalytique

Les inactivateurs autocatalytiques, inhibiteurs suicides, ou MBI (Mechanism-Based Inactivators) sont des analogues de substrats capables d'entrer dans le site actif de l'enzyme et d'être métabolisés. La métabolisation de ces molécules conduit à la formation d'un intermédiaire réactif qui réagit irréversiblement ou quasi- irréversiblement au sein du site actif

de l'enzyme provoquant son inactivation. Ainsi, les enzymes inactivées irréversiblement sont retirées du pool catalytique. Ces inhibiteurs suicides sont donc plus efficaces que les inhibiteurs compétitifs et non compétitifs (Gravot *et al.* 2004).

Le MBI se caractérise par deux constantes cinétiques : k_{inact} et K_I . Le k_{inact} (en min^{-1}) définit la vitesse d'inactivation de l'enzyme pour une concentration saturante d'inhibiteur. Le K_I (en mM) représente l'affinité de l'enzyme pour l'inactivateur. Ainsi, plus le K_I est faible plus l'affinité pour l'inactivateur est forte.

Chez les P450, on distingue quatre types de MBI en fonction du type de liaison covalente mis en jeu : (i) ceux qui se fixent de façon quasi-irréversible sur le fer de l'hème, (ii) ceux se fixant irréversiblement à la protéine, (iii) ceux se fixant irréversiblement à l'hème et enfin (iv) ceux provoquant la dégradation de l'hème.

Certaines furocoumarines et d'autres molécules contenant aussi un noyau furane sont des inhibiteurs suicides efficaces de P450, en particuliers contre les CYP1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 et 7A1. (Fouin-Fortunet *et al.* 1986 ; Sahali-Sahly *et al.* 1996 ; Scott 1996 ; Scott *et al.* 1998 ; Gravot *et al.* 2004 ; Zhou *et al.* 2004). Toutefois, les plantes productrices de furocoumarines présentent une moindre inactivation autocatalytique de leurs P450 que les plantes n'en produisant pas. En effet, Gravot a montré que les C4H de *Ruta graveolens* et *Petroselinum crispum* (plantes productrices de furocoumarines) étaient moins sensibles à l'inactivation par le psoralène et le 8-MOP que la C4H d'*Helianthus tuberosus* (plante non productrice de furocoumarines). Ces observations permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle il y aurait eu une coévolution entre la sélection de P450 résistants aux MBI et l'apparition des furocoumarines (Gravot *et al.* 2004).

Les MBI capables de se fixer covalamment sur la partie protéique des P450 sont utilisés pour identifier des peptides ou des acides aminés présents dans le site actif de l'enzyme. En effet, ces acides aminés sont impliqués soit dans la métabolisation soit dans la fixation du substrat (Roberts *et al.* 1993 ; Chiba *et al.* 1995 ; Koenigs and Trager 1998 ; Melet *et al.* 2003 ; Sridar *et al.* 2005).

3.2 Fonctions des P450 végétaux

Les P450 végétaux déjà caractérisés appartiennent à des voies métaboliques aussi diverses que variées. Il existe beaucoup de P450 pour lesquels aucune fonction n'a été trouvée. Par exemple, sur les 246 séquences codantes de P450 d'*Arabidopsis thaliana*, on dispose d'informations sur la fonction de seulement 46 d'entre elles. Néanmoins, l'ensemble des fonctions déjà identifiées peut se distribuer en deux catégories : la métabolisation de molécules endogènes et la métabolisation de xénobiotiques.

3.2.1 Rôles des P450 dans les voies de biosynthèse

Les cytochromes P450 sont impliqués dans l'ensemble des voies de biosynthèse chez les plantes (Jørgensen *et al.* 2005 ; Ralston and Yu 2006). On les retrouve essentiellement dans les mécanismes d'hydroxylation. Dans le tableau 2 on trouve une liste non exhaustive de P450 récemment clonés et caractérisés, appartenant entre autre aux voies de biosynthèse des glucosinolates, des phénylpropanoïdes, des lipides oxydés, des terpènes et des alcaloïdes.

3.2.2 P450 et métabolisation de xénobiotiques

De par leurs propriétés hydroxylantes et déalkylantes, les cytochromes P450 sont impliqués dans le processus de détoxification de certains xénobiotiques en vue de leur inactivation. Certains P450 ont la capacité d'annihiler les propriétés de molécules exogènes

	Enzymes	P450 ou familles	Références
GLUCOSINOLATES	Z- <i>p</i> -hydroxyphenylacetaldoxime synthase	CYP79A1	(Kristensen <i>et al.</i> 2005 ; Kirsten <i>et al.</i> 2008)
	1- <i>aci</i> -nitro-2-indoyl-éthane synthase	CYP83B1	(Naur <i>et al.</i> 2003)
	<i>p</i> -hydroxymandelonitrile synthase	CYP71E1	(Bak <i>et al.</i> 1998 ; Kristensen <i>et al.</i> 2005 ; Kirsten <i>et al.</i> 2008)
PHENYLPROPANOIDES	cinnamate 4-hydroxylase	CYP73A	(Gravot <i>et al.</i> 2004)
	<i>p</i> -coumaroyl 3'-hydroxylase	CYP98A	(Morant <i>et al.</i> 2002)
	férulate/coniféraldéhyde 5-hydroxylase	CYP84	(Humphreys <i>et al.</i> 1999)
	flavone synthase II	CYP93B	(Yoshikazu 2006)
	flavonoïde 3'-hydroxylase	CYP75B	(Seitz <i>et al.</i> 2007)
	flavonoïde 3'5'-hydroxylase	CYP75A	(Seitz <i>et al.</i> 2007)
	flavonoïde 6-hydroxylase	CYP71D9	(Latunde-Dada <i>et al.</i> 2001)
	dihydroxyisoflavanone synthase	CYP93C2	(Akashi <i>et al.</i> 1999)
	isoflavone 2'-hydroxylase	CYP81E	(Norimoto <i>et al.</i> 2000)
	psoralène synthase	CYP71AJ1	(Larbat <i>et al.</i> 2007)
LIPOXYDATION	acides gras oméga-hydroxylases	CYP86A, 94B, 94C1, 96A, 704A, 97B et 711A	(Benveniste <i>et al.</i> 2006 ; Kandel <i>et al.</i> 2007)
	allène oxyde synthase	CYP74A1	(Hughes <i>et al.</i> 2006)
	hydroperoxyde lyase	CYP74B et C	(Grechkin <i>et al.</i> 2006)
TERPENES	(-)-(4 <i>S</i>)-limonene-3-hydroxylase	CYP71D13	(Wust M. <i>et al.</i> 2001)
	(-)-(4 <i>S</i>)-limonene-6-hydroxylase	CYP71D18	(Wust M. <i>et al.</i> 2001)
	Taxoïdes 2 α -, 5 α -, 7 β -, 13 α -, 14 β -hydroxylases	CYP725A	(Jennewein <i>et al.</i> 2004 ; Kaspera and Croteau 2006)
	carotènes hydroxylases (prédiction)	CYP97	(Quinlan <i>et al.</i> 2007)
	(+)-abscisic acid 8'-hydroxylase	CYP707A	(Mizutani and Todoroki 2006)
ALCALOIDES	(<i>S</i>)- <i>N</i> -methylcoclaurine 3'-hydroxylase	CYP80B3	(Frick <i>et al.</i> 2007)
	hyoscyamine aldéhyde synthase	CYP80F1	(Li <i>et al.</i> 2006)
	sécologanine synthase	CYP72A1	(Collu <i>et al.</i> 2001)

Tableau 2 : Liste non exhaustive de P450 impliqués dans les voies de biosynthèse des glucosinolates, des phénylpropanoïdes, des lipides oxydés, des terpènes et des alcaloïdes.

comme des herbicides ou pesticides. Cette inactivation est généralement réalisée par une hydroxylation ou déalkylation P450-dépendante du substrat, suivie de la complexation avec un sucre et le stockage dans la vacuole ou dans la paroi végétale (Schuler and Werck-Reichhart 2003).

Certains P450 dont la fonction initiale *in vivo* n'est pas connue, sont détournés pour métaboliser des xénobiotiques. Par exemple, CYP76B1 d'*Helianthus tuberosus* catalyse la déalkylation de plusieurs herbicides (chlortoluron, isoproturon, linuron) (Robineau *et al.* 1998 ; Didierjean *et al.* 2002). De plus, CYP71A10 détoxifie *in vivo* le linuron et le chlortoluron (Siminszky *et al.* 2003), tout comme les CYP81B2 et CYP71A11 de tabac qui sont impliqués dans la métabolisation du chlortoluron (Yamada *et al.* 2000).

Par ailleurs, d'autres P450 impliqués dans les voies de biosynthèses de métabolites secondaires comme les CYP73A1, CYP71C6 et CYP81B1 (phénylpropanoïdes, DIMBOA et lipides respectivement) sont également capables de dégrader certains herbicides (Pierrel *et al.* 1994 ; Cabello-Hurtado *et al.* 1998 ; Weng-Sheng *et al.* 2006). Enfin, certains P450 bactériens ont la capacité de dégrader un explosif ; l'hexa-hydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) (Rylott *et al.* 2006 ; Jackson *et al.* 2007).

3.3 Cytochromes P450 clés dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

Au vu du nombre important de P450 de la voie de biosynthèse des furocoumarines, nous n'évoquerons dans cette partie que les enzymes qui ont été impliquées dans les travaux décrits dans ce manuscrit.

3.3.1 La cinnamate 4-hydroxylase

La cinnamate 4-hydroxylase est le P450 végétal le plus étudié à ce jour. Cette enzyme catalyse la conversion du cinnamate en *p*-coumarate, première réaction oxydative de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. L'activité C4H a été décrite à la fin des années 60, dans des pousses de *Pisum sativum* (Russell and Conn 1967). Depuis, cette activité a été détectée dans de très nombreuses plantes supérieures et toutes ces C4H appartiennent à la famille des CYP73. La C4H joue un rôle majeur dans la synthèse des phénylpropanoïdes et en particulier des lignines.

Les caractérisations biochimiques de divers CYP73 dont par exemple CYP73A1 de topinambour, CYP73A32 de rue, CYP73A13 de *Populus tremuloides*, et CYP73A19 de *Cicer arietinum* ont été réalisées (Pierrel *et al.* 1994 ; Batard *et al.* 1997 ; Overkamp *et al.* 2000 ; Ro *et al.* 2001 ; Gravot *et al.* 2004). La cinnamate 4-hydroxylase présente un spectre de substrat assez restreint : le cinnamate est le substrat préférentiel avec des constantes d'affinité (K_m) inférieures à 10 μ M et des vitesses de métabolisation importantes (k_{cat} de 100 à 300 min^{-1}) (Pierrel *et al.* 1994 ; Hubner *et al.* 2003 ; Gravot *et al.* 2004). Plus généralement, les molécules acceptées par la C4H sont des molécules planes, aromatiques, de petite taille possédant un site anionique à l'opposé du site d'hydroxylation, et pouvant présenter des groupements en *ortho* et *meta* (Chen *et al.* 2007). Il existe toutefois des différences entre C4Hs. CYP73A32 de rue et CYP73A10 de persil, plantes productrices de furocoumarines, sont moins sensibles à l'inactivation autocatalytique par le psoralène et le 8-MOP, que CYP73A1 de topinambour, plante non productrice de furocoumarines (Gravot *et al.* 2004).

La cinnamate 4-hydroxylase est exprimée constitutivement dans les tissus ligneux et les tissus qui ont une voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes active (Zhao *et al.* 2005). Lors d'un stress, tel la lumière, les blessures, et les infections de pathogènes, on l'activité C4H est induite (Dixon and Paiva 1995 ; Batard *et al.* 1997 ; Hubner *et al.* 2003 ; Bellés *et al.* 2008). L'accumulation d'ARNm C4H dans les cellules soumises à un stress (Mizutani *et al.* 1997 ; Betz *et al.* 2001 ; Ro *et al.* 2001) montre que la régulation de cette activité est essentiellement de nature transcriptionnelle (Weisshaar and Jenkins 1998). Des études ont montré une corrélation spatiotemporelle entre l'expression de la C4H, de la PAL et de la 4CL

(Hahlbrock and Schröder 1975 ; Bell-Lelong *et al.* 1997a ; Koopmann *et al.* 1999). Il existe également une corrélation positive entre l'activité C4H, PAL et 4CL et le contenu total en acides phénoliques. En effet, sur leur promoteur respectif, il y a présence de plusieurs éléments *cis* conservés dont les boîtes P, L et H qui peuvent fixer des facteurs de transcription du type *myb* et *bHLH* en réponse aux stress (blessure, UV, pathogène) (Whitbred and Schuler 2000 ; Zhao *et al.* 2005).

Toutefois, ces activités enzymatiques sont indépendantes de la quantité d'enzyme présente (Chen *et al.* 2006). Ce qui dénote également d'une régulation post traductionnelle.

3.3.2 La coumaroyl ester 3'-hydroxylase

La Coumaroyl ester 3'-Hydroxylase (C3'H) est une P450 monooxygénase qui se situe à l'embranchement de la voie de biosynthèse des lignines. Elle catalyse la réaction de *meta*-hydroxylation de certains esters de *p*-coumaroyl-CoA. L'activité C3'H a été décrite au milieu des années 80 par l'équipe du docteur Kühnl dans des microsomes de cultures cellulaires élicitées de *Petroselinum crispum* (Heller and Kühnl 1985), ainsi que dans des microsomes issus de cultures cellulaires élicitées de *Daucus carota* L. (Kühnl *et al.* 1987). Depuis, cette activité a été détectée dans un certain nombre de plantes supérieures et toutes ces enzymes appartiennent à la famille des CYP98 (Schoch *et al.* 2001 ; Mahesh *et al.* 2007). La C3'H catalyse une étape importante dans la synthèse des monomères de lignines et de l'acide chlorogénique.

Divers CYP98 ont été caractérisés biochimiquement, dont le CYP98A3 d'*Arabidopsis thaliana* (Schoch *et al.* 2001), les CYP98A35 et 36 de *Coffea canephora* (Mahesh *et al.* 2007), le CYP98A13 de *Ocimum basilicum* (Gang *et al.* 2002) et le CYP98A22 de *Ruta graveolens* (Hehn 2007). Les esters de coumaroyl métabolisés généralement par la C3'H sont le *p*-coumaroyl shikimate et/ou le *p*-coumaroyl quinate. Certaines C3'H métabolisent préférentiellement un des esters de *p*-coumaroyl avec des constantes d'affinité (K_m) inférieures à 20 μ M et des vitesses de métabolisation importantes (k_{cat} de 100 à 700 min⁻¹) (Schoch *et al.* 2001 ; Gang *et al.* 2002 ; Morant *et al.* 2007).

L'expression de la coumaroyl ester 3'-hydroxylase se fait dans les tissus ligneux et est généralement concomitante à l'expression de la C4H. Tout comme le promoteur de la C4H, celui de la C3'H est inductible par les blessures (Nair *et al.* 2002). De plus, une étude récente a montré que l'expression de la C3'H de *Phaseolus vulgaris* (CYP98A5) est inductible par certains composés chimiques comme l'acide 3,5-dichlorosalicylique et l'acide 2,6-dichloroisonicotinique (Basson and Dubery 2007).

La caractérisation de mutants (mutation ponctuelle et d'insertion par un ADN-T) du gène codant pour la C3'H de l'arabette (CYP98A3) a montré une réduction de la croissance, une diminution de la teneur en lignine et un changement de la composition en lignine, ainsi qu'une réduction du phénotype de fluorescence épidermique chez ces mutants (Franke *et al.* 2002a ; Abdulrazzak *et al.* 2006). De plus en supprimant l'expression de la C3'H par ARN interférents, on a constaté comme précédemment une diminution et une variation de la composition de la teneur des cellules en lignines, mais aussi une accumulation de certains composés phénylpropanoïdes (Coleman *et al.* 2008). Chez d'autres mutants d'insertion (ADN-T) du gène codant CYP98A3 ont permis de révéler une diminution drastique de la quantité de scopolétine. L'hypothèse selon laquelle l'acide ferulique serait son précurseur a ainsi été confirmée (Kai *et al.* 2006). Depuis, l'enzyme réalisant cette *ortho*-hydroxylation a été caractérisée par la même équipe (Kai *et al.* 2008).

3.3.3 La psoralène synthase

La psoralène synthase est une P450 monooxygénase réalisant la conversion de la (+)-marmésine en psoralène. L'activité PS a été décrite au milieu des années 80 par l'équipe du professeur Matern dans des microsomes de cultures cellulaires élicitées d'*Ammi majus* (Hamerski and Matern 1988). Cette enzyme, premier P450 de la voie de biosynthèse des furocoumarine à être cloné, l'a été par cette même équipe, puis a été caractérisée biochimiquement par l'équipe du professeur Bourgaud (Larbat *et al.* 2007). La psoralène synthase d'*Ammi majus* (CYP71AJ1) métabolise la (+)-marmésine avec une constante d'affinité (K_m) de l'ordre du micro molaire (1,5 μ M) et une vitesse de métabolisation importante (k_{cat}) de l'ordre de 340 min⁻¹.

4 La transformation génétique chez les végétaux supérieurs

La transformation génétique chez les végétaux a pour objectif l'introduction, l'insertion et l'expression de nouveaux caractères (ou la suppression de caractères) dans le génome des cellules végétales par d'autres moyens que la fusion de gamètes (Birch 1997). La première transformation génétique de plante date de 1983 (Herrera-Estrella *et al.* 1983). Depuis, les différentes technologies se sont développées et on peut les classer en deux grandes méthodes : les méthodes directes et les méthodes indirectes.

4.1 Les différentes techniques de transformations

4.1.1 Les méthodes de transferts directs

4.1.1.1 Par biolistique / agrolistique

La biolistique a été initialement mise au point avec l'objectif de transformer génétiquement les plantes monocotylédones. En effet, ces dernières sont plus difficilement transformables par *Agrobacterium* que les dicotylédones.

La biolistique ou bombardement de particules est une technique utilisant des particules micronisées de métal sur lesquelles l'ADN à transférer est adsorbé. Elles vont ensuite être accélérées avec une vitesse suffisante pour pénétrer la cellule sans lui causer de dommage létal (Klein *et al.* 1987 ; Sanford 1988 ; Rech *et al.* 2008). Les avantages de la biolistique sont la possibilité de co-transformation avec des transgènes multiples, l'intégration de grands fragments d'ADN (YAC) (Mullen *et al.* 1998) et l'intégration de matériel génétique dans les organelles (Maliga 2002).

L'agrolistique combine les avantages de la transformation par *Agrobacterium* et la haute efficacité de transformation de la biolistique (Hansen and Chilton 1996). La séquence du gène que l'on veut insérer est flanquée par les bordures droite et gauche de l'ADN-T. Cela aura pour conséquence une meilleure efficacité de recombinaison du fragment d'ADN exogène à l'ADN endogène.

4.1.1.2 Par micro-injection

C'est une technique permettant le transfert d'organites subcellulaires et de l'ADN dans des protoplastes *via* une injection réalisée par une microseringue. On obtient une efficacité de transformation de l'ordre de 15 à 20% (Crossway *et al.* 1986 ; Holm *et al.* 2000).

4.1.1.3 Par électroporation

L'électroporation de protoplastes et de cellules intègres (Fromm *et al.* 1985 ; 1986 ; Arencibia *et al.* 1995) est une technique basée sur la capacité d'une macromolécule (fragment d'ADN) présente dans le milieu extracellulaire d'être internalisée par une cellule vivante suite à un bref choc électrique (Neumann *et al.* 1982).

4.1.1.4 Par lipofection

La lipofection de protoplastes est une technique basée sur la capacité qu'ont deux membranes biologiques à fusionner. Le fragment d'ADN que l'on veut transférer se trouve dans des liposomes artificiels qui vont fusionner à la membrane cellulaire de protoplastes. Ce fragment d'ADN se trouve alors dans le cytosol (Felgner and Lingold 1989 ; Zhen *et al.* 1994 ; Patrick *et al.* 1999).

4.1.2 Les méthodes de transferts indirects

Les méthodes de transfert indirect utilisent des agents pathogènes qui ont la capacité de transférer tout ou partie de leur génome, telles certaines agrobactéries.

Les agrobactéries utilisées pour la transformation génétique de plantes sont majoritairement *Agrobacterium tumefaciens* (responsable de la galle du collet ou crown gall) ou *Agrobacterium rhizogenes* (responsable de la prolifération anarchique du chevelu racinaire ou hairy roots). Ce sont des bactéries pathogènes du sol, gram négatives, de la famille des rhizobiacées. Les *Agrobacterium* sont classées en fonction du type d'opines dont la synthèse est induite chez la plante : nopaline, octopine pour *A. tumefaciens* ; agropine, mannopine pour *A. rhizogenes*. Les *Agrobacterium* sont des bactéries vivant à l'état saprophytique dans la rhizosphère de nombreuses plantes. La présence d'un gros plasmide appelé plasmide Ti (pour tumor inducing) différencie les *Agrobacterium* pathogènes des non pathogènes. La plupart des *Agrobacterium* pathogènes isolées sont capables d'induire par inoculation des tumeurs sur une vaste gamme de dicotylédones et quelques monocotylédones. Cependant, la sensibilité des plantes d'une part, et la virulence des souches, d'autre part, sont extrêmement variables. Ainsi, certaines variétés d'une même espèce végétale montrent des degrés différents de sensibilité à la même souche d'*Agrobacterium*.

L'utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* présente certains avantages sur les méthodes directes. En effet, le nombre de copies du transgène transféré à la plante est réduit, ce qui diminue le risque potentiel de co-suppression et d'instabilité du transgène (Hansen *et al.* 1997). De plus, c'est un système où une cellule unique est transformée, ce qui évite ainsi l'obtention de plantes chimères comme c'est très souvent le cas en transformation directe (Enriquez-Obregon *et al.* 1997 ; Enriquez-Obregon *et al.* 1998). Et enfin, le transgène est souvent inséré dans des régions de l'ADN transcriptionnellement actives.

4.2 Mécanisme naturel de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*

Cette bactérie réalise son infection au niveau d'une blessure du collet, se traduisant par une tumeur cancéreuse appelée tumeur du collet ou "crown gall". La reconnaissance et l'attachement d'*A. tumefaciens* à la cellule hôte est une étape précoce et essentielle pour le procédé infectieux.

4.2.1 Support moléculaire de la virulence

La virulence d'une agrobactérie se définit comme étant la capacité de celle-ci à infecter des cellules végétales, donc à induire une tumeur. La virulence d'*Agrobacterium tumefaciens* est due à la présence d'un plasmide Ti de 180 kb. La présence de ce plasmide est nécessaire mais pas suffisante à induire la virulence. En effet, si ce plasmide est transféré dans une souche non virulente d'agrobactéries celle-ci devient à son tour capable d'infecter les cellules végétales (Hooykaas *et al.* 1977), alors que s'il est transféré à une souche bactérienne comme *E. coli* celle-ci ne devient pas virulente.

Le plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* (Figure 15) est composé de différentes régions. La première région comporte l'ADN-T flanqué de bordures droite et gauche de 25 pb en orientation directe. Sur l'ADN-T on trouve des gènes oncogènes et des gènes de synthèse d'opines et de cytokinines. Une seconde région est constituée de gènes de virulence organisés en 8 opérons permettant le transfert de l'ADN-T à la cellule végétale. Et enfin le plasmide Ti possède des gènes permettant la conjugaison, des gènes impliqués dans le catabolisme des opines, ainsi qu'une origine de réplication.

L'ADN-T est un segment mobile du plasmide Ti qui sera transféré dans le noyau de la cellule puis s'intégrera dans un chromosome de la plante lors de l'infection. Deux séquences homologues de 25 paires de bases (pb) et de même orientation flanquent l'ADN-T. Ces bordures sont les seuls éléments *in cis* nécessaires pour le transfert de cette région d'ADN.

L'ADN-T contient deux groupes de gènes codant pour des enzymes : un de ces groupes de gènes amène la plante à synthétiser des opines, alors que le deuxième, celui des oncogènes, entraîne une surproduction d'auxine et de cytokinine conduisant au phénotype tumoral. Le processus de transfert de l'ADN-T est médié par l'action de protéines codées par les gènes *vir*. (Hooykaas and Schilperoort 1992 ; Zupan and Zambryski 1995 ; De La Riva *et al.* 1998)

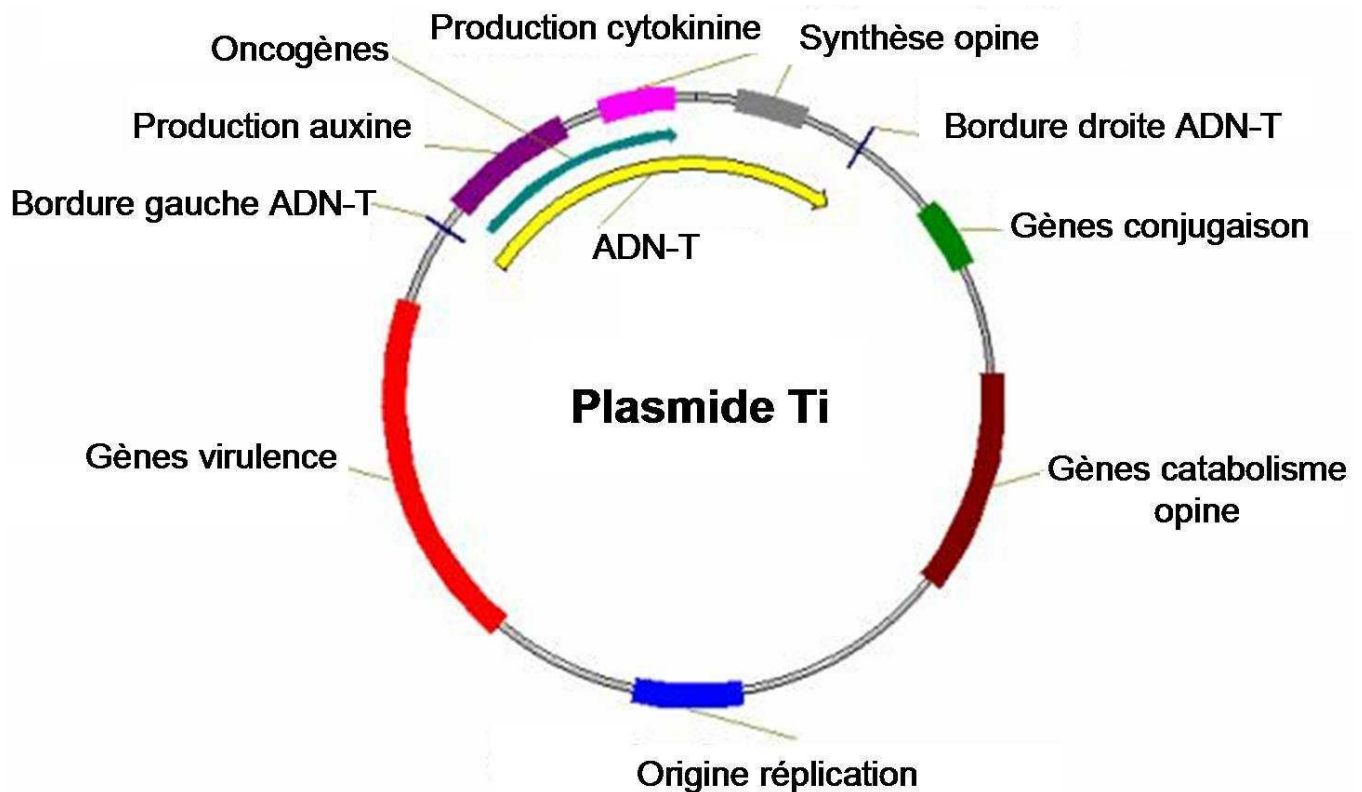


Figure 15 : Carte génétique du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

La région *vir* du plasmide Ti est un régulon de 30 kb composé de 8 opérons. Certains sont essentiels au transfert de l'ADN-T (*virA*, *virB*, *virD*, *virG*, *virF*), d'autres augmentent l'efficacité du transfert (*virC* et *virE*) (Hooykaas and Schilperoort 1992 ; Zupan and Zambryski 1995) et enfin, le dernier est de moindre importance (*virH*) (De La Riva *et al.* 1998). Chacun de ces opérons est constitué de un ou plusieurs gènes : 1 gène pour *virA* et *virG*, 2 pour *virC* et *virE*, 5 pour *virD* et 11 gènes pour *virB*.

4.2.2 Chimiotactisme et induction de la virulence

Au niveau de la blessure, la plante libère des composés phénoliques (acétosyringone, hydroxyacétosyringone...) qui induisent l'expression d'une région du plasmide Ti, les gènes *vir* régissant la reconnaissance plante bactérie et le transfert d'une partie de l'ADN bactérien. Ensuite vient l'accolement et l'attachement de la bactérie à la cellule végétale, puis le transfert d'un fragment de l'ADN du plasmide Ti, appelé ADN de transfert (ADN-T), dans le génome végétal.

Les loci *chvA*, *chvB*, *chvE* et *cell* sont impliqués dans les fonctions de reconnaissance plante-bactérie. Ils sont portés par le chromosome bactérien. Les loci *chvA* et *chvB* sont impliqués dans la synthèse de β -1,2-glucane, un polysaccharide neutre qui est propre aux *Rhizobiaceae* (Cangelosi *et al.* 1989). Le locus *cell* est responsable de la synthèse de fibres de cellulose (Matthysse 1983). Le locus *att* code pour une protéine de la surface cellulaire (Matthysse 1987). Le locus *chvE* intervient comme régulateur (en association avec VirA) des gènes de la région de virulence du plasmide (De La Riva *et al.* 1998). La reconnaissance des composés phénoliques par le complexe protéique transmembranaire formé de *chvE* et *virA* (la seule protéine *vir* exprimée constitutivement) entraîne une autophosphorylation de la protéine *virA* (Johnson and Das 1998). *VirA* est capable de phosphoryler à son tour la protéine cytoplasmique *virG*, qui active et régule la transcription de l'ensemble des gènes *vir* (Stachel and Zambryski 1986) dont les 11 gènes de l'opéron *virB* impliqués dans la synthèse et l'assemblage du T-pilus (Lai and Kado 2002). (Figure 16)

Le complexe *virD1/virD2* reconnaît les séquences consensus des bordures droite et gauche de l'ADN-T, les clivent à une distance de 4 nucléotides de leur extrémité gauche et provoque la synthèse d'un ADN-T simple brin. L'initiation de cette copie simple brin est possible à partir des 2 bordures. Cependant, la fixation de *virC1* sur la séquence over-drive, à proximité de RB, stimule la synthèse du simple brin d'ADN-T à partir de RB vers LB. *VirD2* permet le clivage de l'ADN-T au niveau des 2 bords, et y reste fixé de manière covalente en 5' le protégeant des exonucléases et en le guidant vers le noyau de la cellule végétale. (Stachel and Zambryski 1986)

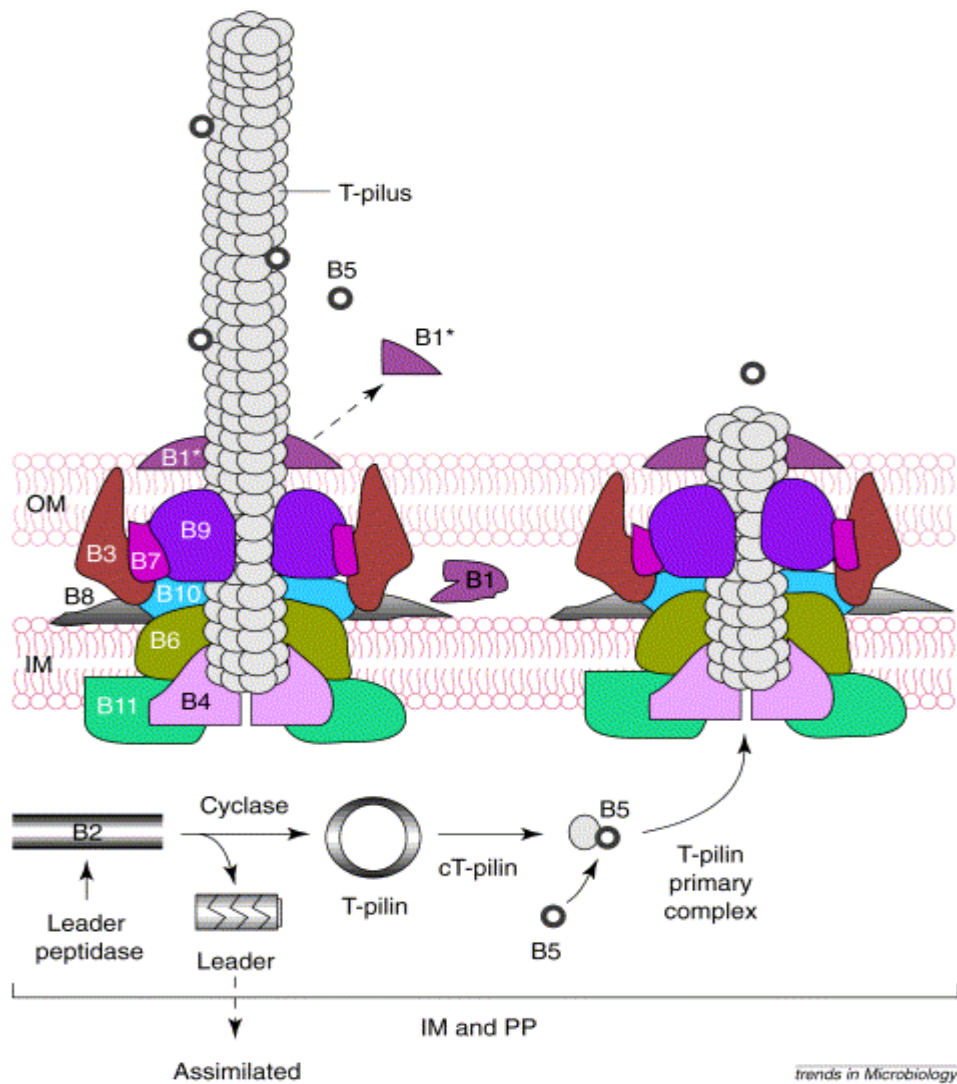


Figure 16 : Modèle de la biogenèse du T-pilus d'*Agrobacterium tumefaciens* via un appareil de transport transmembranaire, appareil composé de protéines virB qui fournissent un échafaudage pour l'assemblage des sous unités de T-pilines. Les protéines virB sont associées à la membrane interne (IM) et/ou externe (OM) ainsi que dans l'espace périplasmique (PP). La protéine virB2 (pro-piline) subit une cyclisation pour donner la T-piline cyclique qui va ensuite se complexer à virB5 pour former le complexe primaire de T-piline. On a enfin assemblage des sous unités de T-piline pour établir le T-pilus. (Lai and Kado 2000)

4.2.3 Transfert et intégration de l'information génétique

L'ADN-T est transféré dans le cytoplasme de la cellule de plante *via* un complexe ADN-protéines (le complexe-T). Ce dernier est formé de l'ADN-T, de la protéine VirD2

attachée à l'extrémité 5', et d'environ 600 molécules de protéines VirE2 recouvrant le simple brin d'ADN-T (Citovsky *et al.* 1987). VirE2 et le reste du complexe-T sont transférés indépendamment dans la cellule de la plante ; le transfert de VirE2 est dépendant de la présence de la protéine VirE1 dans l'agrobactérie (Sundberg *et al.* 1996 ; Mysori *et al.* 1998), et le complexe VirE1-VirE2 via le T-pilus (Chen *et al.* 2000). La formation du complexe-T se termine donc dans le cytoplasme de la cellule végétale.

Les signaux de localisation nucléaire (NLS) présents sur virD2 et virE2 reconnaissent les récepteurs cytoplasmiques de la plante s'y fixent, permettant ainsi le transfert de l'ADN-T vers le noyau végétal. L'insertion de l'ADN-T se fait au hasard et sous forme de recombinaison dans le génome végétal (Mayerhofer *et al.* 1991). Stabilisé, il est ensuite transmis classiquement par division cellulaire aux cellules filles (Zhu *et al.* 2000).

Peu de gènes végétaux ont été identifiés comme ayant un rôle dans le transfert de l'ADN-T. Le plus étudié est le gène *vip1* ; la protéine VIP1 intervient dans le transport du complexe-T du cytoplasme de la cellule végétale vers le noyau, en se fixant à VirE2 (Ward *et al.* 2002 ; Dafny-Yelin *et al.* 2008).

L'insertion de l'ADN-T se fait aléatoirement mais préférentiellement dans les régions de la plante actives au niveau transcriptionnel (Feldmann and Marks 1987 ; Tinland 1996). Plusieurs ADN-T peuvent être transférés dans la même cellule par des bactéries différentes et il arrive souvent que les ADN-T co-transférés s'intègrent au même endroit dans le génome cellulaire. Ceci suggère l'existence de "points chauds" favorables à l'intégration de l'ADN-T (De Block and Debrouwer 1991).

L'insertion de l'ADN-T dans le génome végétal se fait par recombinaison illégitime. En effet, la comparaison de séquence d'ADN génomique avant et après insertion de l'ADN-T montre que les homologies de séquences ne sont pas nécessairement très grandes (Hooykaas and Schilperoort 1992 ; Tinland 1996). L'intégration de l'ADN-T conduit à de courtes délétions de l'ADN végétal au niveau du site d'insertion (13-73 pb) (Hooykaas and Schilperoort 1992). De plus, le côté gauche de l'ADN-T (3') est peu conservé et a une région

homologue avec le site d'insertion d'au moins 5 nucléotides consécutifs. Alors que le côté droit de l'ADN-T (5') est très conservé jusqu'au nucléotide où était liée la protéine VirD2 et a une région homologue avec le site d'insertion qui peut être réduit à une seule base (Tinland 1996). La recombinaison du côté droit de l'ADN-T suggère un mécanisme spécifique différent de la recombinaison bactérienne classique. L'ADN-T peut parfois être rejeté du génome hôte et y laisse quelques empreintes de son intégration passée (Marton 1994).

4.2.4 Mise en place du commensalisme

Avant même son intégration dans le génome de la plante, l'ADN-T peut être transcrit, on parle alors d'expression transitoire (Janssen and Gardner 1989). Les gènes portés par l'ADN-T seront exprimés et permettront la synthèse d'auxines, de cytokinines (responsables de la tumeur végétale), et d'opines. Ces opines synthétisées et sécrétées par les cellules transformées sont sources de carbone et d'azote métabolisables par *Agrobacterium tumefaciens* (Klapwijk *et al.* 1978). La bactérie détourne ainsi la machinerie biosynthétique de la plante à son profit.

4.3 Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens* pour la transformation génétique

Agrobacterium tumefaciens est devenu un outil permettant la transformation génétique de végétaux avant même que les mécanismes moléculaires permettant ce transfert d'information génétique soient totalement connus. L'ADN-T ne contient pas de gènes indispensables au mécanisme de transformation génétique, mais seulement les oncogènes et gènes de synthèse d'opine. Le fait de remplacer ces gènes par des gènes d'intérêt sous contrôle de promoteurs (constitutifs ou non) permet de maintenir le processus de transformation génétique, tout en enlevant les effets tumorigènes indésirables. Un plasmide Ti dans lequel on a remplacé les oncogènes par des gènes d'intérêt, est appelé plasmide Ti désarmé.

Afin d'utiliser *Agrobacterium tumefaciens* comme vecteur pour la transformation génétique des végétaux, différents systèmes ont été mis en place. La taille des séquences d'ADN transférables sans modification peut atteindre 150 Kb grâce au vecteur BIBAC (Hamilton *et al.* 1996). La construction de plasmides Ti synthétiques beaucoup plus petits (environ 10 Kb) que le plasmide Ti naturel (180 Kb) a conféré un grand avantage à cette technique de transformation génétique. Deux systèmes ont été développés : le système de co-intégration et le système binaire.

4.3.1 Le système de co-intégration

Le système de co-intégration est basé sur la recombinaison de deux plasmides, et le but est d'obtenir un plasmide comportant à la fois la région *vir* et l'ADN-T. Par conjugaison bactérienne on transfère le plasmide portant le gène d'intérêt au sein de l'ADN-T contenu dans *E. coli*, vers *A. tumefaciens* qui renferme le plasmide contenant les gènes *vir*. Les deux plasmides se recombinent grâce à une région homologue pour former le plasmide final.

4.3.2 Le système binaire

Dans le système binaire, on va séparer physiquement les gènes *vir* de l'ADN-T. A l'état naturel ces deux régions sont situées sur le même plasmide, mais elles peuvent toutefois agir en *trans*. Comme pour le système de co-intégration, l'ADN-T est contenu dans une bactérie *E. coli*, le plasmide portant les gènes de virulence est contenu dans une bactérie *A. tumefaciens*, mais il n'y a pas de recombinaison entre eux. Généralement, on utilise un troisième plasmide dit "helper" contenu dans une autre bactérie *E. coli*, qui ne peut pas se répliquer chez *A. tumefaciens* et qui augmente le taux de transfert par conjugaison. Le plasmide "helper" améliore l'efficacité de conjugaison sous l'action de ses protéines Tra et Mob (pour transfer et mobilization), codées respectivement par les gènes *tra* et *mob*.

4.3.3 Les gènes de sélection

Un gène de sélection est un gène qui par son expression va conférer un avantage sélectif aux cellules génétiquement transformées. Les gènes de sélections couramment utilisés dans le cadre de la transformation génétique de plantes codent pour des protéines qui métabolisent l'agent sélectif et le rendent ainsi moins cytotoxique. On parle de sélection négative, car seules les transformants vont pouvoir survivre. Toutefois, certaines cellules non transformées présentent une résistance intrinsèque à l'agent sélectif et se multiplient comme les cellules véritablement transformées ; c'est le phénomène d'échappement. Ces marqueurs de sélections sont utilisés en transformation génétique de plante car le taux de cellules transformées est en général très faible.

Le gène de sélection utilisé est fonction du type de matériel végétal utilisé, de la plante pour laquelle on souhaite obtenir des transformants et le type de méthode utilisée pour réaliser la transformation par *A. tumefaciens*.

Les gènes de sélection négative couramment utilisés en transformation génétique sont des gènes qui confèrent une résistance soit aux antibiotiques, soit aux herbicides. A titre d'exemple nous pouvons citer :

- Le gène *nptII* isolé du transposon Tn5 d'*E. coli*, code pour la néomycine phosphotransférase II et confère la résistance à la kanamycine ou à la néomycine (aminosides).
- Le gène *hpt* isolé d'*E. coli* code pour l'hygromycine B phosphotransférase et confère la résistance à l'hygromycine et la généticine G418 (aminosides) (Gritz and Davies 1983).
- Le gène *bar* isolé de *Streptomyces hygroscopicus*, code pour la phosphinotricine acétyltransférase et confère la résistance à la phosphinotricine (glufosinate). Le glufosinate est un inhibiteur de la glutamine synthétase (Thompson *et al.* 1987).

Il existe d'autres gènes de sélection, peu utilisés dans les techniques de transformation génétique de plantes, mais dont l'utilisation semble prometteuse. Ils codent pour des protéines qui métabolisent l'agent sélectif en une substance essentielle à la multiplication de la cellule, substance absente du milieu de culture qui procure un avantage métabolique aux transformants. On parle dans ce cas de sélection positive, car on va sélectionner les cellules transformées sans tuer celles qui ne le sont pas. La sélection positive est basée sur l'état auxotrophique de la plupart des espèces végétales cultivées *in vitro*. En effet, il leur est impossible de se développer sans l'ajout de plusieurs substances (sucres).

Les gènes de sélection positive utilisables en transformation génétique sont des gènes qui codent pour des enzymes de conversion d'un sucre non-métabolisable (mannose, xylose) en une source carbonée utilisable. A titre d'exemple nous pouvons citer :

- Le gène *pmi* isolé d'*E. coli* code la phosphomannose isomérase qui permet la conversion du mannose-6-phosphate en fructose-6-phosphate qui est un sucre métabolisable (Joersbo *et al.* 1998 ; Lucca *et al.* 2001 ; Zhengquan *et al.* 2004).
- Le gène *xylA* isolé de *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* code la xylose isomérase qui permet la conversion du xylose en xylulose qui est alors métabolisé dans la voie des pentoses phosphate (Haldrup *et al.* 1998b ; a).

Les gènes de sélection positive offrent des avantages car ils permettent d'éviter la dissémination de gènes de résistance à des antibiotiques ou d'herbicides. De plus, il semblerait qu'on obtienne de meilleurs taux de transformation qu'avec des gènes de sélection négative (Zhengquan *et al.* 2004).

4.3.4 Choix d'un protocole de transformation génétique

Dans l'absolu il existe une multitude de protocoles de transformation génétique qui se différencient selon le tissu, l'organe, ou plus généralement la plante. La plupart des protocoles s'organisent autour d'une hiérarchisation temporelle des expérimentations. La première étape est de déterminer les conditions de régénération de la plante. En effet, les cellules

transformées doivent avoir la capacité de se multiplier dans le but d'obtenir soit une lignée cellulaire, soit un nouveau clone. Ces études de régénération porteront soit sur des cellules différenciées (feuilles, tiges, hypocotyles), soit sur des cellules indifférenciées (cals, suspensions cellulaires). La seconde étape, nécessaire uniquement lors de l'utilisation d'un gène de sélection négative, porte sur la détermination de la concentration minimale létale en agent sélectif (antibiotique, herbicide). C'est cette concentration qui permet une sélection des cellules transformées. La troisième étape est la détermination des conditions expérimentales optimales afin d'obtenir le taux de transformation le plus important. Ces conditions sont le temps de contact plante / inoculum bactérien, la température, l'éclairage, l'ajout de facteur induisant la virulence (acétosyringone), ainsi que les temps de co-culture et de régénération.

Le choix du matériel végétal de départ, donc du protocole utilisé, est orienté selon les possibilités qu'offre l'espèce végétale et le type de matériel transformé désiré. Lorsqu'il est possible de régénérer un clone à partir de tissus ou d'organes variés pour une même plante, il faut choisir celui qui permettra d'obtenir la meilleure stabilité génétique des transformants et le protocole de transformation le plus efficace. Ce choix s'opère en connaissance des avantages et contraintes qu'offre le type de cellules (différenciées ou non), tissus ou organes utilisés.

Transformation de cellules indifférenciées

Elle offre une facilité de transformation génétique des cellules, mais possède des contraintes très importantes dont le phénomène de variation somaclonale. En effet, la culture à long terme de cellules indifférenciées est à l'origine de réarrangements chromosomiques pouvant conduire entre autre à une perte des fonctions menant à la régénération de plantes entières. Considérée à l'origine comme un énorme potentiel de source de variation génétique pour l'amélioration génétique, la variation somaclonale est un handicap majeur dans le cadre du transfert de gènes. Dans ces conditions, l'apparition d'un caractère recherché ou non ne peut être imputée à la seule introduction du transgène. De plus, la régénération de plantes à partir d'un mélange de cellules transformées (ou non) peut conduire à la formation de chimères.

Transformation de cellules différenciées

Elle offre, lorsque le tissu ou l'organe s'y prête, une facilité de transformation génétique. Ne passant pas par une phase de culture de cellules indifférenciées, on limite les risques de variation somaclonale. La seule contrainte à utiliser des protocoles sur des cellules différenciées est la logistique à mettre en place pour préparer extemporanément les tissus ou organes.

Le protocole utilisé pour transformer *Ruta graveolens* est la transformation de cellules différenciées. Il a été mis au point par Lièvre *et col.* (Lièvre *et al.* 2005), et s'effectue sur des hypocotyles de rue qui ont une bonne capacité de régénération.

5 Objectifs de recherche : exploration fonctionnelle de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

Nous connaissons, métaboliquement parlant, l'ensemble de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, et même plus spécifiquement celle des furocoumarines. Toutefois, peu d'enzymes du métabolisme des psoralènes ont été clonées et caractérisées, et que dire de leur fonction *in vivo*. En effet, les mécanismes régissant la régulation au plan moléculaire de ces flux métaboliques n'est que très partiellement connue.

L'ensemble des travaux de cette thèse a été réalisé au sein de l'UMR 1121, Laboratoire Agronomie et Environnement Nancy Université - INRA Nancy-Colmar. Elle a débuté suite aux travaux de thèse réalisés sur *Ruta graveolens* par Karine Lièvre (Lièvre *et al.* 2005) et Antoine Gravot (Gravot *et al.* 2004), et a été concomitante de la fin de thèse de Romain Larbat (Larbat *et al.* 2007). Le travail qui m'a été proposé en début de thèse était de participer et de contribuer à l'exploration fonctionnelle de la voie de biosynthèse des furocoumarines au sein d'une plante modèle ; *Ruta graveolens*. Nonobstant le caractère fondamental de cette thèse qui me fut proposé, l'objectif personnel que je m'étais fixé en sus du travail demandé

était de débloquent un verrou qui permettrait une surproduction significative de furocoumarines.

Au cours de cette thèse, de nouveaux gènes codant pour des enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ont été clonés et caractérisés. L'exploration fonctionnelle de la voie de biosynthèse des furocoumarines a démarré avec le clonage et la caractérisation biochimique de la C4H de rue grâce aux travaux de thèse d'Antoine Gravot (Gravot *et al.* 2004). Quasiment en parallèle, les travaux de thèse de Karine Lièvre ont d'abord débouché sur la mise en place d'un protocole de transformation génétique de *Ruta graveolens* à partir d'hypocotyles (Lievre *et al.* 2005), et se sont terminés par la production d'un nombre important de rues transformées génétiquement avec le gène de la C4H de rue sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou fleur. Mes débuts de thèse ont été concomitants de la fin de celle de Karine Lièvre. Ainsi, j'ai continué les travaux qu'elle avait entrepris, i.e la caractérisation moléculaire et biochimique des transformants C4H. Suite au clonage et à la caractérisation de la C3'H de *Ruta graveolens* par Alain Hehn et suite aux résultats obtenus par Franke (Franke *et al.* 2002b) et Abdulrazzak (Abdulrazzak *et al.* 2006), nous avons entrepris en septembre 2005 d'étudier l'impact de la modulation de l'expression de l'activité C3'H sur l'ensemble de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Le clonage de la PS d'*Ammi majus*, premier gène de la voie de biosynthèse des furocoumarines, ainsi que sa caractérisation biochimique ont été réalisés par Romain Larbat (Larbat *et al.* 2007). Nous avons ainsi pu dès janvier 2006, entreprendre la construction de rues transformées avec la psoralène synthase d'une autre plante sous contrôle du promoteur constitutif 35S, puis étudier l'impact de cette transformation sur l'ensemble de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Chapitre II : Matériel et méthodes

1 Matériel

1.1 Matériel végétal : *Ruta graveolens* L.

Le matériel végétal utilisé pour cette étude est issu de germinations de graines de *Ruta graveolens* provenant de la société Conrad Appel, Samen und Pflanzen GmbH, Bismarckstraße 59, 64293 Darmstadt, Allemagne.

1.2 Souches bactériennes

Agrobacterium tumefaciens C58C1Rif^R (pGV2260)

Cette souche désarmée est utilisée comme vecteur de transformation génétique. Le gène de résistance à la rifampicine est porté par le chromosome bactérien. Le plasmide pGV2260 est un vecteur désarmé qui porte les gènes de virulence nécessaires à l'infection des plantes, ainsi que le gène de résistance à la carbénicilline.

Escherichia coli HB101 (pRK2013)

Cette souche possède le plasmide helper pRK2013 facilitant la conjugaison entre bactéries. Elle est utilisée pour l'incorporation des plasmides portant les transgènes dans les agrobactéries par conjugaison. Elle porte le gène *mob* codant pour les protéines *mob* (mobilising) et le gène *tra* (transfer).

Génotype : supE44, hsdS20 (rB- mB-), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1.

Escherichia coli MC1061

Cette souche est utilisée pour véhiculer les plasmides pBIN-X vers la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rif^R par le mécanisme de conjugaison triparentale.

Génotype : hsdR2, hsdM+, hsdS+, araD139 Δ (ara-leu)7697, Δ (lac)X74, galE15, galK16, rpsL (StrR) mcrA, mcrB1.

Escherichia coli ccdB SurvivalTM

Cette souche est résistante aux effets toxiques du gène *ccdB* et est utilisée pour l'amplification et le maintien de vecteurs contenant le gène *ccdB*.

Génotype : F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG tonA::Ptrc-ccdA.

Escherichia coli TOP10

Cette souche est utilisée pour l'amplification des constructions plasmidiques. Elle permet une répllication stable des plasmides à fort nombre de copies.

Génotype : F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

Escherichia coli XL1 Blue

Cette souche est utilisée pour l'amplification des constructions plasmidiques. Elle est déficiente pour l'activité de restriction (hsdR-) mais comporte un système de méthylation actif (hsdM+).

Génotype : endA1 gyrA96 hsdR17(rk-mk+) lac recA1 relA1 supE44 thi-1 F'[proAB, lacIqZ Δ M15, Tn10(Tetr)].

1.3 Matériel plasmidique

Le matériel génétique que j'ai été amené à utiliser au cours de ma thèse peut être présenté en deux parties distinctes : les plasmides ayant été mis à ma disposition tels quels (plasmides de départ), et ceux que j'ai dû construire afin d'obtenir les vecteurs de transformation génétique de plantes ou de levures (plasmides recombinants).

1.3.1 Plasmides de départ

pBIN m-gfp5-ER

Le plasmide pBIN m-gfp5-ER nous a été fourni par le professeur Jim Haselhoff, Division of Cell Biology, MRC Laboratory of Molecular Biology, Addenbrookes Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, UK.

C'est un plasmide navette à faibles copies, qui a la capacité de se répliquer aussi bien dans *Escherichia coli* que dans *Agrobacterium tumefaciens*. Entre les bordures droite et gauche délimitant l'ADN-T de ce plasmide se situent le gène de sélection *npt II* conférant la résistance à la kanamycine aux plantes transformées et le gène rapporteur *m-gfp5-ER* codant pour une protéine verte fluorescente mutée. Le gène *nptII* est sous contrôle du promoteur et du terminateur de la nopaline synthase (Pnos, et 3'nos), et le gène rapporteur *m-gfp5-ER* est sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur 3'nos. Il porte également un second gène *nptII* à l'extérieur de son ADN-T conférant une résistance à la kanamycine aux *E. coli* recombinantes.

pCR8[®]/GW/TOPO[®]

Le vecteur pCR8[®]/GW/TOPO[®] (Invitrogen) est un vecteur d'entrée de type Gateway[®] utilisé pour cloner rapidement et directement des produits de PCR. Il est fixé de façon covalente à une topoisomérase de type I pour une ligation rapide et entraînant plus de 95% de recombinants. Ce vecteur possède deux extrémités sortantes 3'-T permettant d'une part la ligation de produits de PCR en empêchant la recircularisation du vecteur et d'autre part en offrant une extrémité complémentaire aux produits PCR dont les extrémités 3' sont additionnées d'une adénine grâce à certaines *Taq* DNA polymerases. Les différents plasmides recombinants issus de ce vecteur seront nommés pCR8-GW-X.

Le vecteur pCR8[®]/GW/TOPO[®] comporte des sites *att* (Figure 17) pour une rapide recombinaison vers un vecteur de destination de type Gateway[®] (ici pBIN-GW), un gène conférant la résistance à la spectinomycine, deux sites *EcoRI* flanquant le site d'insertion de l'amplicon afin de permettre une meilleure excision de l'insert, et des sites GW primer qui sont

avec les régions *att* localisés à moins de 55 paires de bases du site d'insertion du produit de PCR dans le but d'optimiser le séquençage.

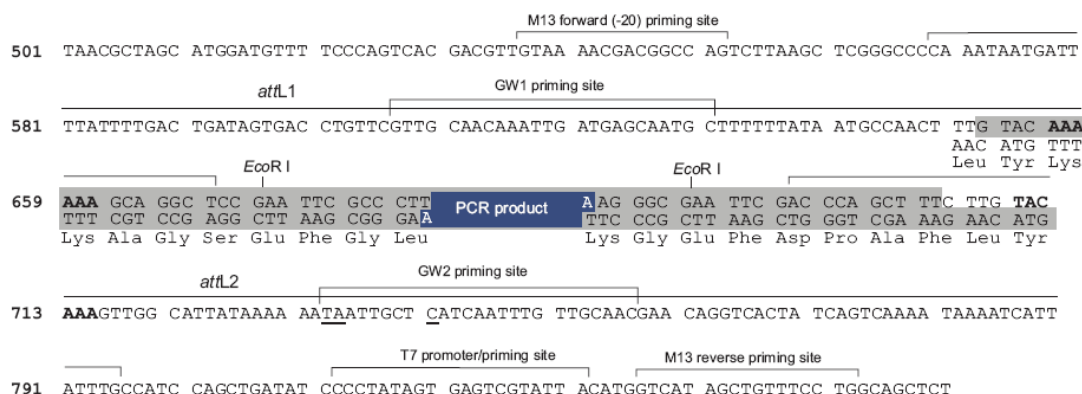


Figure 17 : Polylinker du plasmide pCR8®/GW/TOPO®.

pGEM-T

Le vecteur pGEM-T (Promega) (Figure 18) est utilisé pour cloner des produits de PCR. Il est constitué du vecteur pGEM-5Zf(+) coupé par *EcoRV* auquel est ajouté un résidu thymine à chaque extrémité 3'. Ces 3'-T permettent la ligation de produits de PCR en empêchant la recircularisation du vecteur et en offrant une extrémité complémentaire aux produits PCR dont les extrémités 3' sont additionnées d'une adénine grâce à certaines *Taq* DNA polymerases. Les différents plasmides recombinants issus de ce vecteur seront nommés pGEM-X.

Le pGEM-T est un plasmide à fort nombre de copies composé de la séquence *oriC*, du gène *amp* responsable de la résistance à l'ampicilline, de l'opérateur *lac* suivi d'une sous-unité de la β -galactosidase. Il possède également les promoteurs reconnus par les ARN polymérases T7 et SP6 des deux cotés du polylinker, ce qui permet une éventuelle transcription *in vitro*. Ce polylinker est lui-même inséré dans la région codante de la sous-unité α de la β -galactosidase. L'insertion d'un produit de PCR inactive ce gène, ce qui permet de sélectionner les clones recombinants par criblage coloré sur milieu LB contenant l'indicateur coloré X-Gal (substrat de la β -galactosidase) et de l'IPTG induisant le gène par l'intermédiaire de l'opérateur *lac*.

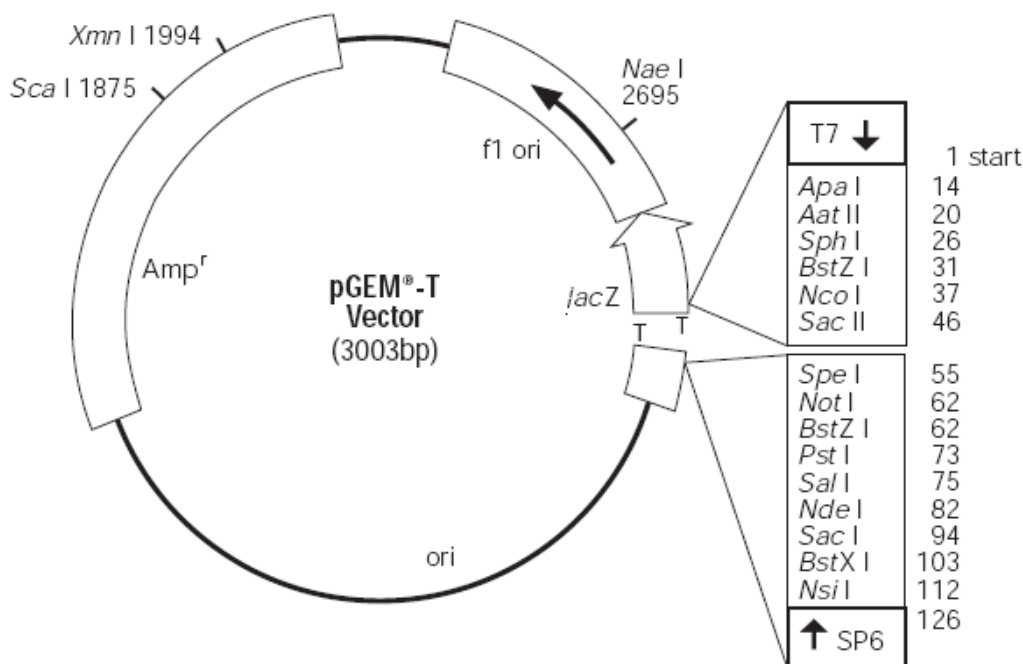


Figure 18 : Plasmide pGEM-T.

1.3.2 Plasmides recombinants

pBIN-73A32

C'est un plasmide à faible nombre de copies, dérivant du vecteur pBin m-gfp5-ER et possédant les mêmes caractéristiques biologiques. Ce qui diffère est la séquence de l'ADN-T. Entre les bordures droite et gauche délimitant l'ADN-T de ce plasmide, se situent le gène de sélection *npt II* conférant la résistance à la kanamycine aux plantes transformées et le transgène *cyp73A32* codant pour la Cinnamate 4-Hydroxylase de *Ruta graveolens* (n° NCBI : AJ309127). Le gène *nptII* est sous le contrôle du promoteur et du terminateur de la nopaline synthase (Pnos, et 3' nos), et le gène *cyp73A32* cloné entre les sites de restrictions *Bam*HI et *Sac*I est sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV et du terminateur 3' nos.

pBIN-link

Ce vecteur d'expression dérive du plasmide pBin m-gfp5-ER. C'est un plasmide à faible nombre de copies. Entre les bordures droite et gauche délimitant l'ADN-T de ce plasmide se situent le gène de sélection *npt II* et un polylinker *Bam*HI / *Sma*I / *Eco*RI / *Kpn*I /

SacI. Le gène *nptII* est sous le contrôle du promoteur et du terminateur de la nopaline synthase (Pnos, et 3'nos). Le polylinker est encadré en amont par le promoteur 35S et en aval par le terminateur 3'nos.

pBIN-GW

C'est un plasmide de destination Gateway[®], à faible nombre de copies. Il dérive du vecteur pBIN-link. Entre les bordures droite et gauche délimitant l'ADN-T de ce plasmide se situent le gène de sélection *npt II* et la cassette de recombinaison RfB. Le gène *nptII* est sous le contrôle du promoteur et du terminateur de la nopaline synthase (Pnos, et 3'nos). La cassette de recombinaison RfB, clonée au niveau du site de restriction *Bam*HI (rendu franc par l'utilisation du fragment de Klenow de la T4 DNA Polymérase, puis déphosphorylé) du polylinker, est encadrée en amont par le promoteur 35S et en aval par le terminateur 3'nos. Les différents plasmides recombinant issus de ce vecteur seront nommés pBIN-GW-X.

pBIN-GW-98A22

Ce plasmide est constitué du vecteur pBIN-GW contenant la séquence codante de la Coumaroyl 3'-Hydroxylase de *Ruta graveolens* (CYP98A22) cloné entre les sites de recombinaison *Att*R1 et *Att*R2. Il est utilisé pour l'expression de CYP98A22 dans des plants de rue génétiquement transformés.

pBIN-GW-98A22INV

Ce plasmide est constitué du vecteur pBIN-GW contenant la séquence codante de la C3'H de *Ruta graveolens* (CYP98A22) cloné en orientation inverse entre les sites de recombinaison *Att*R1 et *Att*R2. Il est utilisé pour diminuer l'expression de CYP98A22 dans des plants de rue génétiquement transformés par interférence ARN.

pBIN-GW-98A3

Ce plasmide est constitué du vecteur pBIN-GW contenant la séquence codante de la C3'H d'*Arabidopsis thaliana* (CYP98A3) (n° NCBI : NM_180006) entre les sites de recombinaison *Att*R1 et *Att*R2. Il est utilisé pour l'expression de CYP98A3 dans des plants de rue génétiquement transformés.

pBIN-GW-71AJ1

Ce plasmide est constitué du vecteur pBIN-GW contenant la séquence codante de la psoralène synthase d'*Ammi majus* (CYP71AJ1) (n° NCBI : AY532370) cloné entre les sites de recombinaison *AttR1* et *AttR2*. Il est utilisé pour l'expression de CYP71AJ1 dans des plants de rue génétiquement transformés.

2 Milieux de culture

2.1 Milieux pour cultures végétales

Toutes les étapes de culture *in vitro* de *Ruta graveolens* sont réalisées sur du milieu de Murashige et Skoog (MS) solide (Murashige and Skoog 1962) additionné de 12 g/L d'agar et de 30 g/L de saccharose ; MS(30). La composition de ce milieu est donnée dans l'annexe 1.

2.2 Milieux pour cultures bactériennes

Le milieu LB (Luria-Bertani) est utilisé pour la croissance des souches d'*Escherichia coli*.

- LB liquide : ce milieu est obtenu en mélangeant du NaCl (10 g/L), du bactotryptone (10 g/L) et d'extraits de levure (5 g/L) dans de l'eau ultrapure. Le milieu est autoclavé 20 minutes à 121°C à 1 bar, puis conservé à température ambiante.
- LB agar : pour obtenir un milieu LB solide, 16 g/L d'agar sont ajoutés au LB liquide avant autoclavage.

Le milieu SOC liquide est utilisé pour multiplier les différentes souches *E. coli* qui ont subi une transformation peu avant leur étalement sur milieu gélosé sélectif. Ce milieu est obtenu en mélangeant du tryptone (20 g/L), de l'extrait de levure (5 g/L), du NaCl (10 mM), du KCl (2,5 mM), du MgCl₂ (10 mM), du MgSO₄ (10 mM) et du glucose (20 mM). Le milieu est autoclavé 20 minutes à 121°C à 1 bar puis conservé à température ambiante.

Le milieu YEB est utilisé pour la croissance des souches d'*Agrobacterium tumefaciens*.

- YEB liquide : ce milieu est obtenu en mélangeant du Bacto beef extract (5 g/L), du bacto yeast extract (1 g/L), du peptone (5 g/L) et du saccharose (5 g/L) dans de l'eau ultrapure. Le milieu est autoclavé 20 minutes à 121°C à 1 bar puis conservé à température ambiante.
- YEB agar : pour obtenir un milieu YEB solide, 16 g/L d'agar sont ajoutés au YEB liquide avant autoclavage.
- YEB Mg²⁺ agar : ce milieu est obtenu en ajoutant 0,25 g/L de MgSO₄ et 16 g/L d'agar au milieu YEB liquide avant autoclavage.

2.3 Antibiotiques utilisés

Les antibiotiques sont utilisés pour la sélection d'une souche bactérienne recombinante particulière. Ils sont utilisés à la concentration finale indiquée dans le tableau 4, après dilution de leur solution stock (Tableau 3). Les antibiotiques sont toujours ajoutés au milieu après autoclavage. Dans le cas des milieux solides, ils sont ajoutés lorsque le milieu est en surfusion (environ 50°C) juste avant de couler les boîtes.

Antibiotiques	concentrations	Solvant
Ampicilline	100 mg/mL	Eau
Carbénicilline	100 mg/mL	Eau
Chloramphénicol	25 mg/mL	Eau
Kanamycine	25 mg/mL	Eau
Rifampicine	100 mg/mL	DMSO
Spectinomycine	50 mg/mL	Eau

Tableau 3 : Concentrations des solutions mères d'antibiotiques et solvants utilisés.

Souches	Vecteurs	Antibiotiques	Concentrations
XL1 Blue	pGEM-T	Ampicilline	100 mg/L
	pBIN-X	Kanamycine	25 mg/L
TOP 10	pCR8/GW/TOPO	Spectinomycine	50 mg/L
ccdB Survival TM	pBIN-GW	Chloramphénicol	30 mg/L
MC1061	pBIN-X	Kanamycine	25 mg/L
HB101	pRK2013	Kanamycine	25 mg/L
C58C1 Rif ^R	pGV2260	Rifampicine	100 mg/L
		Carbénicilline	100 mg/L
	pGV2260, pBIN-X	Rifampicine	100 mg/L
		Carbénicilline	100 mg/L
		Kanamycine	25 mg/L

Tableau 4 : concentrations finales d'antibiotiques à ajouter au milieu nutritif en fonction de la souche bactérienne et du plasmide utilisé.

3 Méthodes de biologie moléculaire

3.1 Extractions d'ADN génomique de feuilles de *Ruta graveolens*

Les extractions d'ADN de rue ont été effectuées à partir de plantes cultivées *in vitro* âgées de 3-4 mois minimum. *Ruta graveolens* synthétise de nombreux métabolites

secondaires, composés phénoliques et polysaccharides, qui rendent difficile l'extraction de son ADN, particulièrement dans le cas de plantes cultivées *in vitro*.

Les feuilles de rue sont prélevées, déposées dans un tube de 1,5 mL puis plongées dans de l'azote liquide avant d'être broyées par un pilon. Le broyage s'effectue dans l'azote liquide afin d'éviter tout réchauffement du prélèvement. Les ADN de rues ont été extraits de la poudre grâce au DNeasy plant minikit de Qiagen, utilisé comme indiqué par le fournisseur. L'ADN est élué dans un volume de deux fois 50 µL de Tris HCl pH 8 (1 mM).

3.2 Amplification d'un fragment d'ADN par PCR

Amplification classique d'une séquence :

Toutes les amplifications PCR (Mullis K. B. and Faloona F. A. 1987) sont conduites dans un thermocycler Icyler (Bio Rad). De façon générale, les réactions sont réalisées dans un volume de 25 µL contenant : 0,4 µM de chaque amorce sens et antisens, 0,4 mM de dNTP, 2,5 µL de tampon d'activité polymérase 10X, 2 à 5 U de *Taq* DNA polymerase et de 10 à 100 ng d'ADN matrice.

La réaction débute par une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, suivie de 25 à 35 cycles comprenant chacun une étape de dénaturation (95°C pendant 30 secondes), une étape d'hybridation (entre 50 et 60°C pendant 45 secondes) et une étape d'élongation (72°C en comptant 1 minute pour 1000 pb). La température d'hybridation dépend de la température de fusion (T_m) des deux amorces déterminée par leur longueur et leur teneur en base purique. La T_m est définie par l'équation :

$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - 650/N$, où N est la longueur en paire de base. La température d'hybridation correspond généralement à $T_m - 5^\circ\text{C}$.

La première étape est la dénaturation à 95°C des brins d'ADN pour permettre aux brins complémentaire de l'ADN matrice de se déshybrider. La seconde étape est l'hybridation des amorces au niveau des séquences complémentaires à une température optimale permettant un appariement spécifique (T_m). La troisième étape est l'élongation, elle permet la synthèse

du brin complémentaire par la *Taq* DNA polymérase à 72°C. Une fois ce premier cycle terminé, le second commence et ainsi de suite jusqu'à atteindre le nombre de cycles nécessaire pour l'amplification désirée.

Amplification spécifique à un clonage :

Le mélange de PCR contient 0,8µM de chaque oligonucléotide, deux unités de Platinum[®] Pfx DNA Polymérase (Invitrogen), 300 µM de chaque dNTP, du tampon Platinum[®] Pfx 1X, 1,5 mM de MgSO₄ et 50 ng de vecteur. La PCR débute à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles d'amplifications (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, puis une minute trente à 68°C), avant de terminer par 15 minutes à 68°C. Deux unités de *Taq* DNA polymérase (Invitrogen) sont ajoutées en tout début du dernier cycle de PCR, afin qu'une adénine soit ajoutée en 3' de chaque amplicon. Ceci permettant alors de faciliter le clonage dans le vecteur d'entrée de type Gateway[®] ; le plasmide pCR8[®]/GW/TOPO[®].

3.3 Extraction d'ARN de feuilles de *Ruta graveolens* L

Les extractions d'ARN totaux de rue ont été effectuées à partir de plantes cultivées *in vitro* âgées de 3-4 mois minimum. *Ruta graveolens* synthétise de nombreux métabolites secondaires, composés phénoliques et polysaccharides, qui rendent difficile l'extraction de son ARN, particulièrement dans le cas de plantes cultivées *in vitro*. De plus ces composés pourraient altérer les réactions enzymatiques pour lesquelles l'ARN extrait serait le support.

Pendant toute l'expérimentation, du prélèvement jusqu'à l'élution, il est obligatoire de manipuler proprement et avec des gants pour éviter toute contamination par des RNases. Les feuilles de rue sont prélevées, déposées dans un tube de 1,5 mL puis plongées dans de l'azote liquide avant d'être broyées par un pilon. Le broyage s'effectue dans l'azote liquide afin d'éviter toute décongélation du prélèvement. Les ARN de rues ont été extraits de cette poudre grâce au RNeasy plant minikit (Qiagen). On réalise également une DNase sur l'échantillon en cours d'extraction en suivant les recommandations du fournisseur. L'ARN est élué dans un volume de 50 µL de tampon d'élution RNase free.

3.4 Synthèse d'ADNc

La synthèse des ADNc se fait en mélangeant 8 µL d'ARN (1 µg maximum), 10 µL de 2X RT Reaction Mix (Invitrogen) et 2 µl de RT Enzyme Mix (Invitrogen). Le mélange RT Reaction Mix contient 2,5 µM d'oligo (dT)₂₀, des random primers hexamériques (2,5 ng/µL), 10 mM de MgCl₂ et des dNTP (1 mM). La solution RT Enzyme Mix contient du RNaseOUT™ et de la SuperScript™ III RT (Invitrogen). Le contenu des microtubes est incubé à 25°C pendant 10 minutes afin que les oligo (dT) et les random primers puissent s'hybrider aux ARNs. Il s'ensuit une incubation à 50°C pendant 30 minutes pour que la polymérisation se fasse. La réaction est terminée par une incubation à 85°C durant 5 minutes pour inactiver la transcriptase inverse puis le microtube est déposé sur la glace.

Deux UI d'*E. coli* RNase H sont ensuite ajoutés à la solution, puis l'ensemble est incubé à 37°C pendant 20 minutes. Cette réaction permet la dégradation des ARNs hybridés aux brins complémentaires des ADNc. Comme pour l'extraction des ARNs, il est nécessaire de travailler avec des gants afin de ne pas contaminer les échantillons par des RNases.

3.5 Extraction d'ADN plasmidique

Une colonie bactérienne ayant poussée sur milieu sélectif et contenant le plasmide d'intérêt est repiquée dans 2,5 mL de milieu LB liquide additionné de l'antibiotique approprié. Après 17 heures de culture sous agitation à 37°C, les bactéries sont sédimentées par centrifugation (7000 g pendant 5 minutes). Les plasmides sont extraits à l'aide du kit genalute miniprep plasmid (Sigma). L'ensemble du protocole suivi se trouve en annexe 3. L'ADN plasmidique est élué dans deux fois 50 µL de tris-HCl pH 8 (1 mM).

3.6 Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Les ADN sont séparés en fonction de leur poids moléculaire sur gel d'agarose compris entre 0,8% et 2%, en fonction de la taille de ceux ci. Avant le dépôt, les échantillons d'ADN (25 µL) sont additionnés de 5 µL de tampon de charge (Tris 50 mM pH 7,5 ; EDTA 100 mM pH 7,5 ; 10 % glycérol ; 0,05 % bleu de bromophénol). Lors de la migration, le gel d'agarose, baigné dans du tampon TAE (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM), est soumis à une tension généralement de 120 V pendant 40 minutes. Le gel est ensuite trempé 10 minutes dans un bain de bromure d'éthidium (1 µg/mL), puis les ADN sont observés aux UV ($\lambda = 254$ nm).

3.7 Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

Après migration et révélation aux UV, les bandes de gel contenant l'ADN sont découpées à l'aide d'une lame de scalpel propre, puis placées dans un microtube de 1,5 mL. L'ADN est extrait à l'aide du kit d'extraction QIAEX II (Qiagen) en suivant le protocole situé en annexe 4.

3.8 Digestion par enzymes de restriction

La réaction de digestion est généralement réalisée dans un volume de 20 µL contenant ; 2 µL de tampon d'activité 10 X, 10 UI d'enzyme de restriction et entre 0,1 et 1 µg d'ADN à digérer. Au besoin, et si les tampons d'activité sont compatibles, la réaction peut être menée avec deux enzymes en même temps. La digestion est généralement incubée une heure à la température d'activité optimale de l'enzyme.

3.9 Purification et précipitation d'un ADN digéré

Ce protocole est utilisé pour récupérer un ADN digéré qui va subir une seconde digestion, mais par une enzyme qui ne fonctionne pas dans la première solution tampon utilisée. On ajoute de l'eau qsp 400 μ L, puis on ajoute un volume de phénol/chloroforme/IAA (49/49/3) avant de mélanger la solution avec un vortex. Cette étape de purification permet de séparer l'ADN qui se trouve dans la phase aqueuse, des protéines dénaturées (enzymes) qui elles se trouvent dans la phase chloroformique. Après centrifugation 10 minutes à vitesse maximale (environ 14000 g) on prélève la phase supérieure aqueuse à laquelle on ajoute 15 μ L d'acétate de sodium à 3 M. On ajoute 1 mL d'éthanol absolu et on place l'échantillon à -20°C pendant 30 minutes afin que l'ADN puisse précipiter. Après une centrifugation de 20 minutes à vitesse maximale on enlève la solution alcoolique par renversement, puis on rajoute dans le même tube 500 μ L d'éthanol à 70%. On centrifuge à nouveau pendant 10 minutes à vitesse maximale (14000 g), puis on élimine l'éthanol à l'aide d'un pipetman. Le culot d'ADN est laissé séché à l'étuve pendant 10 minutes, puis est resuspendu dans 10 μ L d'eau ultrapure purifiée ou avec une solution de tris-HCl pH 8 (1 mM) en fonction de l'utilisation future de l'ADN.

3.10 Ligations

Ligation dans le plasmide pCR[®]8/GW/TOPO[®]

La ligation d'un produit PCR dans le vecteur d'entrée de type Gateway[®] pCR[®]8/GW/TOPO[®] est réalisée dans un volume total de 6 μ L contenant : 1 μ L de solution saline (tampon), 1 μ L de vecteur, et 4 μ L de produit de PCR (de 50 à 100 ng/ μ L). La ligation est réalisée 5 minutes à température ambiante.

Ligation dans le plasmide pGEM-T

La ligation d'un produit PCR dans le vecteur pGEM-T est réalisée dans un volume de 10 μ L contenant : 5 μ L de tampon d'activité 2X, 3 UI de T4 DNA ligase (Promega), 1 μ L de vecteur (50 ng/ μ L), et 3 μ L d'insert (de 50 à 100 ng/ μ L). La ligation peut être réalisée 2

heures à température ambiante, mais son efficacité est augmentée en la laissant toute la nuit à 4 °C.

3.11 Construction d'un vecteur de destination Gateway®

Principe

La technologie Gateway® est une méthode de clonage universelle basée sur les propriétés de recombinaison site spécifique du bactériophage lambda pour permettre un transfert rapide et efficace de notre gène d'intérêt vers de multiples systèmes plasmidiques. Pour exprimer notre gène d'intérêt dans les plantes en utilisant la technologie Gateway®, il suffit simplement de :

- Cloner notre gène d'intérêt dans un vecteur d'entrée Gateway® tel que pCR8®/GW/TOPO®.
- Transférer le clone présent dans le vecteur d'entrée de type Gateway® à notre vecteur de destination Gateway® en réalisant une réaction de recombinaison.
- Introduire notre clone dans une cellule végétale afin d'exprimer notre protéine recombinante.

Le système de conversion de vecteur Gateway® nous permet de convertir facilement n'importe quel vecteur de notre choix en un vecteur de destination Gateway®. En ligant une cassette contenant les sites *attR* flanquant le gène *ccdB* et le gène de résistance au chloramphénicol (Figure 19) dans un site de clonage multiple de notre plasmide, nous pouvons créer notre propre vecteur de destination pour l'expression de n'importe quelle protéine native.

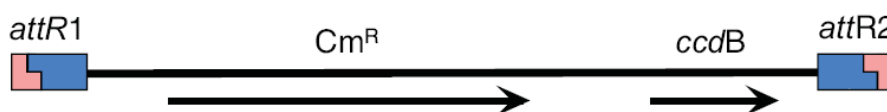


Figure 19 : Représentation d'une cassette de conversion Gateway®. Les sites *attR1* et *attR2* flanquent le gène *ccdB* et le gène de résistance au chloramphénicol

Il existe 3 cassettes qui diffèrent chacune d'un nucléotide (RfA, 898 pb ; RfB, 899 pb ; RfC.1, 899 pb) (voir figure 20). En fonction du site de clonage de la cassette, on choisira celle qui permet de conserver le cadre de lecture initial.

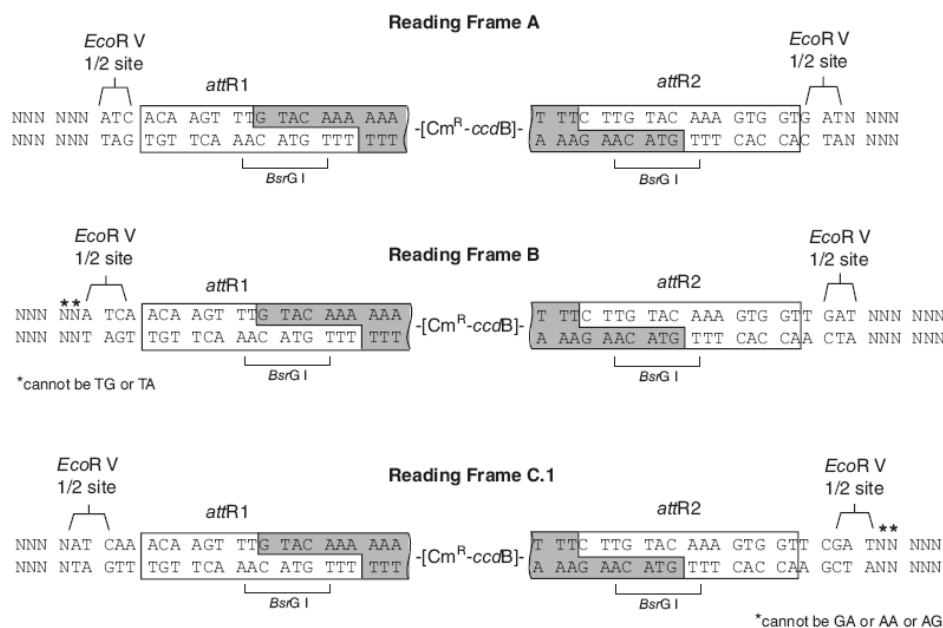


Figure 20 : Caractéristiques principales des 3 cassettes Gateway®.

Conversion d'un plasmide en un vecteur de destination Gateway[®]

Le protocole commence par une digestion d'environ 5 µg de plasmide avec l'enzyme (ou les enzymes) de restriction appropriées. Si nécessaire, convertir les extrémités sortantes du vecteur en extrémités franches en utilisant la T4 DNA polymérase ou fragment de Klenow selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Les 5' phosphates sont ensuite ôtés avec la phosphatase alcaline de veau (CIAP). La réaction de ligation se réalise dans un volume total de 10 µL contenant du vecteur linéarisé déphosphorylé (20-50 ng), 2 µL de tampon de ligation 5X, 2 µL de cassette (RfA, RfB, RfC.1), et une unité de T4 DNA ligase. L'incubation se fait la nuit à 16°C, puis le mélange de ligation est utilisé pour transformer la souche *Escherichia coli* ccdB Survival™. En effet, seule cette souche est résistante aux effets CcdB et peut supporter la propagation de plasmides contenant le gène *ccdB*.

3.12 Recombinaison par la technologie Gateway®

Principe

La recombinaison s'effectue entre un plasmide d'entrée de type Gateway® et un vecteur de destination Gateway®. La séquence qui se situe entre les sites *attL1* et *attL2* du plasmide pCR8-GW-X est recombinée avec la séquence se trouvant entre les sites *attR1* et *attR2* du plasmide de destination Gateway®. La solution plasmidique est ensuite utilisée pour transformer des cellules compétentes *E. coli* TOP10. Seules les cellules ayant incorporées les vecteurs recombines (donc n'ayant plus le gène *ccdB*) pourront se développer sur milieu sélectif.

Réaction de recombinaison

Dans un tube de 1,5 mL on mélange à température ambiante 150 ng de plasmide de destination pBIN-GW linéarisé au niveau du site de restriction *SalI*, 150 ng de plasmide pCR8-GW-X et 2 µL d'enzyme LR Clonase™ (Invitrogen) pour un volume total de 10 µL. La réaction est incubée une nuit à 25°C. On ajoute ensuite 1 µL de protéinase K (Invitrogen) au mélange avant de l'incuber 10 minutes à 37°C. La solution est ensuite utilisée pour transformer par choc thermique des cellules *E. coli* TOP10. Les bactéries sont enfin étalées sur boîte LB sélective puis placées à 37°C pendant la nuit.

3.13 Préparation de bactéries électrocompétentes

On ensemence 2 mL de milieu LB liquide avec 4 colonies indépendantes de bactéries fraîchement étalées sur boîte LB. On incube à 37°C, sous agitation, pendant une nuit. A partir de la préculture, on ensemence 200 mL de milieu LB liquide. L'incubation se fait à 37°C pendant environ 3 heures, jusqu'à ce que l'absorbance à 550 nm soit comprise entre 0,5 et 0,9. On transfère les cultures bactériennes dans des tubes de 50 mL et on les place à 4°C pendant 2 heures. On centrifuge ensuite pendant 5 minutes à 4°C et 4000 g sans frein et sans accélération (Jouan Br4i). Le culot est resuspendu délicatement sans forte agitation. On effectue 2 lavages à l'eau ultra pure stérile froide (50 mL chaque fois). Après le second lavage

le culot de bactéries est repris dans 20 mL de solution glycérolée (10% v/v) froide. On centrifuge pendant 5 minutes à 4°C et 4000 g, sans frein et sans accélération. On réalise un dernier lavage avec 50 mL de solution glycérolée (10% v/v) froide. Le culot est enfin resuspendu dans 1 mL de solution glycérolée à 10%. On aliquote par 45 µL et on congèle dans de l'azote liquide avant de stocker les tubes à -80°C pendant 3 mois maximum.

3.14 Transformation génétique de bactéries par électroporation

Technique utilisée pour transformer la souche bactérienne *Escherichia coli* XL1 Blue. L'électroporation consiste à introduire un plasmide dans des bactéries dont les membranes sont ponctuellement rendues poreuses par un choc électrique court et de haut voltage. La manipulation est réalisée en mélangeant 1 à 10 ng de plasmide à un aliquote de bactéries électrocompétentes. Après les avoir mélangés doucement à la pipette, les bactéries et le plasmide sont déposés dans une cuve à électroporation (2 mm de distance entre les électrodes), placée dans un Pulseur (Bio-Rad). Les bactéries sont soumises à un choc électrique ($V = 2,5 \text{ kV}$; $R = 200 \text{ } \Omega$; $C = 25 \text{ } \mu\text{F}$), puis ressuspendues dans 500 µL de milieu SOC et placées pendant 1 heure à 37°C. Ce laps de temps permet aux bactéries transformées d'acquérir la résistance à l'antibiotique apportée par le plasmide. Les bactéries sont enfin étalées sur boîte LB sélective puis placées à 37°C pendant la nuit.

3.15 Transformation génétique de bactéries par choc thermique

Technique utilisée pour transformer la souche bactérienne *Escherichia coli* MC1061

A partir d'une préculture de 3 mL réalisée la veille, on ensemence au 1/100^{ème} une culture (15 mL) et on laisse pousser à 37°C jusqu'à une absorbance à 550 nm d'environ 0,5. Après 10 minutes sur la glace, la culture est centrifugée à 4000 g pendant 5 minutes à 4°C, puis le surnageant est jeté et le culot dissocié. Ensuite, 7,5 mL d'une solution refroidie et stérile de CaCl₂ (100 mM) est ajoutée à ce dernier. La suspension est laissée 45 minutes sur la glace, puis centrifugée à 4000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot dissocié. Celui-ci est resuspendu avec 1 mL d'une solution refroidie et stérile de CaCl₂ (100

mM), et le tout peut être stocké pendant 12 à 24 heures. A ce stade, les cellules sont compétentes.

On additionne 50 ng de mélange plasmidique à 200 µL de cellules compétentes et ensuite on laisse reposer 30 minutes sur la glace. Un choc thermique de 2 minutes à 42°C est infligé à la solution, puis celle-ci est immédiatement remise sur la glace, avant d'y ajouter 800 µL de milieu SOC. Les bactéries sont incubées au moins 1 heures à 37°C. Enfin, la suspension bactérienne est étalée sur boîte de pétri contenant les antibiotiques appropriés.

Technique utilisée pour transformer les souches bactériennes *Escherichia coli* TOP10 et ccdB Survival™

Pour chaque transformation il faut décongeler le tube d' *E. coli* One Shot® (Invitrogen) compétentes sur de la glace. On y ajoute 2 µL de produit de ligation et on mélange doucement. On laisse incubé sur la glace pendant 30 minutes. On réalise un choc thermique de 30 secondes à 42°C, puis on transfère immédiatement le tube sur la glace. On rajoute 250 µL de milieu SOC et on laisse incubé au moins 1 heures à 37°C. Pour terminer, la suspension est étalée sur boîte de pétri contenant les antibiotiques adéquats.

3.16 Séquençage

Le séquençage des ADN est réalisé par le service de séquençage d'ADN de l'IBMP de Strasbourg ou l'entreprise MWG Biotech.

4 Méthode de transformation génétique de *R. graveolens*

Toutes les étapes de mise en culture *in vitro* se déroulent sous une hotte à flux laminaire horizontal préalablement stérilisée durant 30 minutes par un rayonnement UV et nettoyée à l'alcool à 70°. Le matériel métallique (pinces, lames, ciseaux) employé est stérilisé au four pasteur à 170°C. Les solutions, le matériel en verre (pots), et le papier sont stérilisés

par un autoclavage de 20 minutes à 121 °C à 1 bar. La culture de *Ruta graveolens* L. en conditions axéniques est initiée à partir de graines.

4.1 Conjugaison triparentale

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rif^R renferme le plasmide désarmé pGV2260 sur lequel se trouvent les gènes de virulence. La souche *E. coli* MC1061 renferme un des plasmides pBIN-X. Le transfert du vecteur portant l'ADN-T dans *Agrobacterium tumefaciens* est facilité par la présence du plasmide helper pRK2013 présent dans une souche d'*Escherichia coli* HB101. Ce type de conjugaison est nommé la conjugaison triparentale.

Pour réaliser la conjugaison triparentale, les bactéries sont d'abord mises en culture en milieu liquide :

- Une colonie d'*Escherichia coli* MC1061 contenant un des plasmides pBIN-X dans 2 mL de milieu LB additionnés de kanamycine (25 µg/mL).
- Une colonie d'*Escherichia coli* HB101 contenant le plasmide pRK2013 dans 2 mL de milieu LB additionnés de kanamycine (25 µg/mL).
- Une colonie d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Rif^R (pGV2260) dans 2 mL de milieu YEB additionnés d'ampicilline (100 µg/mL) et de rifampicine (100 µg/mL).

Ces souches d'*Escherichia coli* et d'*Agrobacterium tumefaciens* sont mises en culture sous agitation (200 rpm) pendant une nuit, à 37 et 28°C respectivement. 100 µL de chacune des 3 cultures sont prélevés et mélangés dans un tube de 1,5 mL stérile. L'ensemble est étalé stérilement à l'aide d'un râteau sur un milieu YEB Mg²⁺. Après une nuit de culture à 28°C, la conjugaison triparentale est terminée.

Le tapis de bactéries est récupéré avec 2 mL de milieu LB et placé dans un tube stérile de 2 mL. On prélève 500 µL de la solution qui sont étalés sur une boîte de pétri contenant du milieu YEB solide additionné des antibiotiques auxquels résistent les agrobactéries contenant le plasmide pGV2260 et le plasmide pBIN-X porteur de l'ADN-T.

Après 48 heures de culture à 28°C les agrobactéries sont repiquées sur un nouveau milieu nutritif avant d'être utilisées pour la transformation génétique.

4.2 Préparation de l'inoculum d'agrobactéries

Les agrobactéries C58C1Rif^R (pGV2260, pBin-X) sont cultivées 3 jours à 28°C sur du milieu YEB solide supplémenté en antibiotiques. Pour la transformation, une colonie a été prélevée et mise en culture dans 4 mL de milieu liquide YEB (additionnés des mêmes antibiotiques) et cultivée à 28°C pendant 12 à 16 heures sous une agitation à 200 rpm. Lorsque l'absorbance à 550 nm est de 0,5 on ajoute de l'acétosyringone (125 µM). L'acétosyringone permet d'activer les gènes de virulence. Une fois l'absorbance à 550 nm comprise entre 0,8 et 1, les agrobactéries sont centrifugées à 2000 g pendant 3 minutes puis le culot est resuspendu dans 4 mL de milieu liquide YEB. Une fois resuspendues, elles sont à nouveau centrifugées puis remises en suspension dans 4 mL de milieu MS(30). Ces deux lavages nous permettent d'éliminer les antibiotiques présents dans la solution et qui pourraient perturber la transformation génétique. L'ensemble de la suspension est diluée dans 50 mL de milieu MS(30) BAP(0,1) liquide.

4.3 Germination de graines de *Ruta graveolens* L

Les graines sont placées dans une boule à thé permettant une manipulation plus aisée et une limitation des risques de contamination. Elles sont scarifiées 10 minutes dans de l'acide sulfurique à 95% afin de faciliter leur germination et pour éliminer certains contaminants présents à la surface de la graine après rinçage à l'eau courante. Leur stérilisation est obtenue par une immersion pendant 5 minutes dans de l'hypochlorite de calcium à 7% (m/v), qui est ensuite éliminé par 3 rinçages à l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite récupérées à l'aide d'une spatule stérile et sont étalées sur milieu LB agar. On essaye d'obtenir une densité d'environ 40 à 50 graines par boîte de Pétri de diamètre 8,5 cm.

4.4 Transformation génétique d'hypocotyles de *Ruta graveolens*

La transformation de rue s'effectue sur des hypocotyles âgés de 2 ou 3 semaines, qui seront par la suite mis en co-culture avec *Agrobacterium tumefaciens* afin de réaliser l'étape du transfert de l'ADN-T vers de rares cellules végétales. Les explants sont ensuite déposés sur un milieu sélectif afin de sélectionner les quelques cellules génétiquement modifiées et de permettre l'obtention de plantules à partir de celles-ci.

Les explants sont laissés 30 minutes en contact avec l'inoculum bactérien avant d'être séchés sur du papier filtre stérile pour éliminer l'excès de bactéries, puis sont transférés sur le milieu de co-culture [MS(30)BAP(0,1) acétosyringone (50 mg/L)].

Après 3 jours de co-culture à l'obscurité, les agrobactéries doivent être éliminées. Pour cela, les explants sont plongés 15 minutes dans de l'eau ultrapure stérile et ensuite 15 minutes dans une solution de base minérale liquide MS(30)BAP(0,1) additionnée de céfotaxime à la concentration de 500 mg/L. Ensuite les explants sont séchés sur des papiers filtres stériles et placés sur un milieu de régénération [MS(30)BAP(0,1) céfotaxime (300 mg/L)].

Après une semaine sur milieu de régénération, les explants sont placés sur un milieu de sélection [MS(30)BAP(0,1) kanamycine (75 mg/L) céfotaxime (300 mg/L)].

Au bout d'un mois, certaines cellules transformées ont donné naissance à des tiges feuillées de 1 cm. Celles-ci sont alors repiquées dans des pots (200 mL) contenant du milieu MS(30)BAP(0,1) contenant 75 mg/L de kanamycine afin de maintenir la pression de sélection.

Les plantules résistantes à la kanamycine au bout d'un mois, i.e celles qui n'ont pas blanchi, sont multipliées et mises à enraciner sur du milieu MS(30).

5 Méthodes biochimiques

5.1 Extraction éthanolique de phénylpropanoïdes

L'extraction des furocoumarines et autres composés phénylpropanoïdes est effectuée sur des rues cultivées *in vitro*. Les prélèvements sont réalisés sur la 3^{ème} feuille en partant du bas de la plante. Les feuilles de rue sont prélevées, placées dans un tube de 1,5 mL puis congelées dans de l'azote liquide, avant d'être lyophilisées pendant 24 heures. Elles sont ensuite broyées avec un pilon avant d'être pesées. 500 μ L d'un mélange éthanol : eau ultrapure (v/v) sont ajoutés à toute la poudre issue du broyage afin d'y solubiliser les dérivés phénylpropanoïdes. L'homogénéisation du broyat est obtenue en vortexant vigoureusement toutes les 10 minutes pendant 30 minutes. Après une centrifugation de 8 minutes à 8000 g, le surnageant dans lequel se trouvent les phénylpropanoïdes est prélevé et filtré à l'aide d'un filtre Minisart RC 4 de 0,45 μ m de chez Sartorius®, puis stocké à -20°C jusqu'à l'analyse par HPLC.

5.2 Extraction des lignines de *Ruta graveolens*

L'extraction des lignines a été réalisée par le Professeur Catherine Lapierre, directrice de l'Unité de Chimie Biologique AgroParisTech-INRA, AgroParisTech Centre de Grignon (78850 Thiverval-Grignon, France).

5.2.1 Principe de la thioacidolyse

Les structures les plus caractéristiques des lignines natives sont représentées en figure 21. Il s'agit d'unités phénylpropanes C6C3 engagées dans des liaisons labiles (de type β -O-4) et dont le noyau aromatique porte 2 (unités Syringyles S), 1 (unités guaiacyles G) ou zéro (unités p-OH phényles H) groupes méthoxyles. Les lignines d'angiospermes dicotylédones sont essentiellement constituées d'unités G et S, accompagnées de traces d'unités H. Au cours

de la lignification, les unités H et S apparaissent aux stades précoces de la lignification des parois et les unités S aux stades plus tardifs.

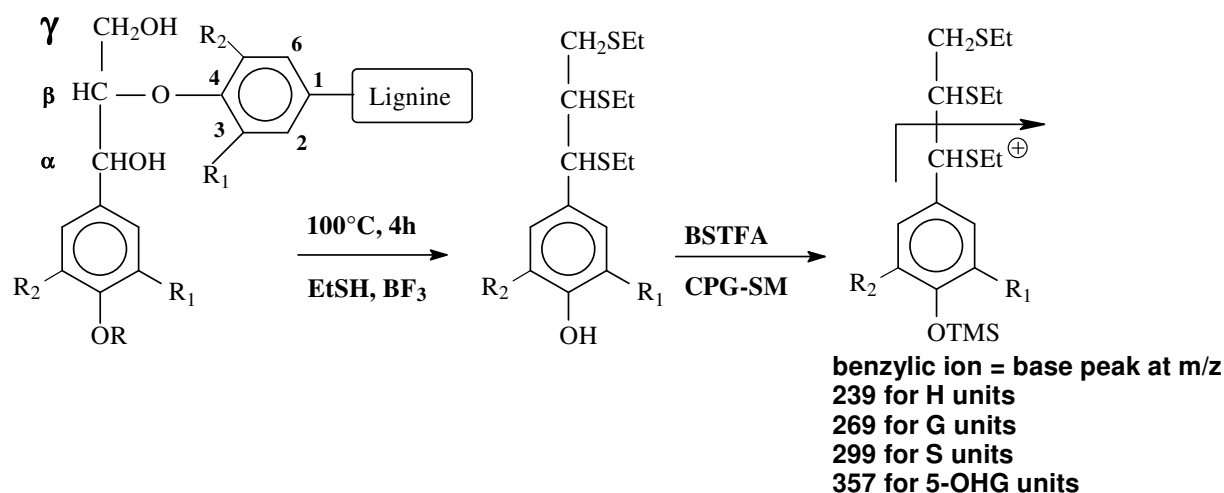


Figure 21 : Principe de la méthode employée pour évaluer la structure des lignines des tiges de rue témoin et transgéniques. Les unités H ($R_1=R_2=H$), G ($R_1=OCH_3$, $R_2=H$), et S ($R_1=R_2=OCH_3$) engagées uniquement dans des liaisons β -O-4 génèrent des monomères thioéthylés spécifiques. Après silylation (BSTFA), ces monomères sont analysés en CPG-SM (impact électronique). Les chromatogrammes reconstruits sur les ions benzyliques propres à chacun d'eux permettent d'évaluer de manière univoque la fréquence relative des unités ayant généré ces monomères. La présence d'autres constituants phénoliques dans l'échantillon n'interfère normalement pas.

Lorsqu'elles sont soumises à thioacidolyse, les unités H, G ou S liées seulement en β -O-4 génèrent des monomères thioéthylés H, G ou S. Le rendement en produits monomères de thioacidolyse reflète d'une part la teneur en lignines et d'autre part la fréquence de ces liaisons labiles au sein des lignines. Les produits obtenus viennent spécifiquement des lignines car, même s'il existe d'autres composés phénoliques dans l'échantillon végétal, ces composés génèrent d'autres produits.

Les monomères en C_6C_3 de type *p*-Hydroxyphényle **H**, Guaiacyle **G** et Syringyle **S** sont dosés par rapport à l'étalon interne (C21, ions spécifiques retenus pour la prise de surface) et en prenant la surface des ions les plus caractéristiques (indiqués en figure 1 : 239 pour H, 269 pour G, 299 pour S). Chacun de ces monomères thioéthylés est obtenu sous

forme d'un mélange de 2 diastéréoisomères erythro/threo, dans des proportions équivalentes (on a un doublet de pic chromatographique pour chacun).

5.2.2 Extraction des lignines

On prélève une rue *in vitro* âgée de 4 semaines, et on lui enlève les racines et toutes les feuilles. Les tiges sont placées dans un tube à hémolyse non fermé et mises pendant deux jours sous une hotte à flux laminaire horizontal afin de sécher. Les tiges de rue séchées sont broyées (0,5 mm). Toutes les manipulations du réactif et milieu réactionnel sont réalisées sous une hotte (EtSH : seuil de détection 10 ppm). Une quantité de 20 mg environ a été placée en tube en verre à vis, avec les 2 étalons internes et 10 mL de réactif de thioacidolyse (dixanne/EtSH 9/1, 0,2M BF₃ etherate) préparé extemporanément. Le tube fermé par un bouchon à joint téflon a été chauffé 4 heures à 100°C (bain d'huile). Après refroidissement dans la glace, le milieu réactionnel est récupéré, dilué par 20 mL d'eau et 5 mL de NaHCO₃ (0,4M). Le pH est vérifié et ajusté (papier pH) à environ 1-2 (ajouter une goutte HCl 6M si nécessaire), avant extraction par 3x 50 mL CH₂Cl₂ (pestipur). Les extraits organiques sont réunis, séchés sur sulfate de sodium et évaporés à l'évaporateur rotatif (avec piège à eau de javel entre l'appareil et la trompe à eau). Le résidu final est resuspendu en 1 mL de solvant et silylé (5 µL par 100 µL de BSTFA + 10 µL de pyridine).

6 Méthodes analytiques

6.1 Dosage de composés phénylpropanoïdes par HPLC

Les furocoumarines et autres phénylpropanoïdes contenues dans les 50 µL de solvant injectés sont dosées à l'aide d'une chaîne HPLC Beckman. Cette chaîne est constituée d'un injecteur automatique (System Gold Autosampler 508 de Beckman-Coulter), d'un système de pompes (System Gold Programmable Solvent Module 126 de Beckman-Coulter) et d'un détecteur à barrette de diode (System Gold Diode Array Detector Module 168 Beckman-

Coulter). Ces différents éléments sont pilotés par un ordinateur équipé du logiciel Beckman System Gold 32 Karats.

La phase mobile est composée d'eau ultra pure acidifiée par de l'acide trifluoroacétique (0,1%) d'une part et d'un mélange 50:50 de méthanol : acétonitrile. Le débit des solvants est constant et égal à 1 mL/minute.

La phase stationnaire est une colonne Macherey Nagel C18 100-10 250 nm protégée par une pré-colonne Purospher LiChroCART 4-4.

La méthode utilisée repose sur une séparation en phase inverse à l'aide d'un gradient convexe commençant à 90% d'eau ultrapure purifiée et 10% de Méthanol-Acétonitrile (50:50) pour atteindre 30% de Méthanol-Acétonitrile (50:50) en 30 minutes. On réalise un palier de 30 minutes à ce même pourcentage. On passe ensuite à 90% Méthanol-Acétonitrile (50:50) sur 5 minutes en gradient convexe, suivi d'un palier de 8 minutes. On repasse ensuite à 10% Méthanol-Acétonitrile (50:50) en 2 minutes, suivi de 10 minutes de rééquilibration. Dans ces conditions de séparation, les furocoumarines sont éluées entre 45 et 60 minutes dans l'ordre suivant : psoralène, xanthotoxine, bergaptène. Les droites de calibration sont préparées à partir de molécules du commerce (Sigma).

6.2 Dosage des lignines

Le dosage des lignines a été réalisé par le Professeur Catherine Lapierre, directrice de l'Unité de Chimie Biologique AgroParisTech-INRA, AgroParisTech Centre de Grignon (78850 Thiverval-Grignon, France). L'échantillon silylé est analysé par CPG-SM selon les conditions décrites dans la littérature.

6.3 Quantification du nombre de transcrits par real time PCR

Principe

Cette technique nous permet de comparer le niveau transcriptionnel d'un gène entre plantes génétiquement transformées et plantes sauvages. Pour éviter le maximum de biais expérimentaux qui pourraient survenir lors de l'extraction d'ARN et de la synthèse d'ADNc, on calcule le ratio entre le gène d'intérêt et un gène rapporteur s'exprimant constitutivement dans la plante. C'est le ratio pour un gène donné chez une plante génétiquement transformée qui sera comparé au même ratio chez une plante sauvage.

Composition du mélange

Lorsque l'on réalise des réactions multiples, il est important de préparer un « master mix » avec les composants communs. On additionne le volume approprié de « master mix » dans chaque tube, et on additionne ensuite les composants uniques de la réaction. Cette préparation est cruciale en qPCR pour réduire les erreurs de pipetage. Au final, dans chaque tube, on doit avoir 25 µL de Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), 1 µL de chaque amorce (10 µM), et 5 µL d'ADNc préparé extemporanément. On complète avec de l'eau RNase free jusqu'à obtenir un volume final de 50 µL.

Il est nécessaire pour cette expérimentation de commander des amorces n'ayant pas été en contact avec de l'acétonitrile dans le processus de purification.

Programmation de l'appareil

- 50°C pendant 2 minutes
- 95°C pendant 2 minutes
- 40 cycles de : 95°C, 30 secondes
 60°C, 1 minute

La réaction d'amplification se termine par 70 étapes de 10 secondes. Le premier cycle commence à 62°C et le dernier se termine à 97°C, ce qui se traduit par une augmentation de la température de 0,5°C à chaque cycle. Cette partie terminant l'amplification nous permet de tracer la courbe de fusion. Les courbes d'amplifications de chaque échantillon sont ensuite analysées.

7 Traitement statistique des données

L'analyse statistique des données est réalisée avec l'aide du logiciel Excel.

Chapitre III : Modification de la voie des phénylpropanoïdes de *Ruta graveolens* par génie métabolique

Au sens que lui donne Bailey, "le génie métabolique est l'amélioration des activités cellulaires par la manipulation d'enzyme, de transport et de fonctions régulatrices de la cellule avec l'utilisation de la technologie de l'ADN recombinant" (Bailey, 1991). Il permet ainsi grâce à l'expérimentation de moduler l'expression spatio-temporelle d'un ou de plusieurs gènes chez une plante. En outre, il exploite et permet une meilleure connaissance des régulations s'opérant au sein d'une voie de biosynthèse. Par conséquent, l'utilisation du génie métabolique devrait permettre une exploration fonctionnelle de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes au sein de *Ruta graveolens*.

Nous avons choisi d'intervenir sur la voie de synthèse des furocoumarines en modifiant par construction génétique le niveau d'expression de 4 gènes. Au total, 5 types de transformants ont été produits. Ces 5 transformations ont été réalisées avec le gène codant pour la C4H et C3'H de rue, le gène codant pour la C3'H d'*A. thaliana*, la séquence non codante de la C3'H de *R. graveolens*, et la PS d'*A. majus*. Nous avons appliqué les mêmes méthodes afin d'obtenir les différentes familles de transformants. Cette redondance implique de fait une même démarche dans la mise en valeurs des résultats. Les résultats décrits dans ce chapitre seront discutés dans un contexte global dans la partie suivante.

Afin de mieux appréhender les variabilités intra spécifiques rencontrées dans les résultats, il est important de rappeler que chaque individu (témoin ou transformé) est unique génétiquement. En effet, chaque plante (témoin et transformée) est issue d'une germination et non d'une bouture.

1 Transformants K-73A32

1.1 Mise à disposition du matériel biologique

L'étude moléculaire de la voie de biosynthèse des furocoumarines a été initiée dans le cadre des thèses d'Anthoine Gravot et de Karine Lièvre qui ont respectivement isolé le gène codant pour la Cinnamate 4-Hydroxylase de *R. graveolens*, et mis au point un protocole de transformation génétique de cette plante. Le gène codant pour la C4H étant la première enzyme de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, K. Lièvre a entamé une étude sur la surexpression de ce gène chez la rue. Les transformants K-73A32 ont ainsi été produits au cours de sa thèse (Lièvre *et al.* 2005). Ce sont des plantes potentiellement transformées qui possèdent en plus de leur gène codant pour CYP73A32, au moins une copie de ce gène sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV. Cette insertion est concomitante à celle du gène *nptII* se trouvant également sur l'ADN-T potentiellement inséré dans le génome de la plante. En effet, comme cela a été expliqué dans le chapitre « matériel et méthodes », l'ADN-T de pBIN-73A32 contient le gène d'intérêt et le gène conférant la résistance à la kanamycine.



Figure 22 : Jeune plant de rue venant d'être repiqué dans un nouveau milieu nutritif MS(30).

Au cours de sa thèse, 49 transformants ont été générés. Ces 49 individus cultivés *in vitro* issus d'évènements uniques de transformation ont été mis à ma disposition. Chaque plante potentiellement transformée a été multipliée dans le but de fournir le matériel végétal nécessaire à leur caractérisation moléculaire et leur analyse biochimique. C'est par des techniques de cultures *in vitro* que cette multiplication végétative a été réalisée. (Figure 22)

1.2 Caractérisation moléculaire des transformants K-73A32

La caractérisation moléculaire des transformants consiste à vérifier la présence du transgène au sein de l'ADN génomique des différentes plantes potentiellement transformées par la construction 35S::*cyp73A32*. Ces plantes résistantes sont capables de se développer sur un milieu nutritif contenant de la kanamycine. La résistance à cet antibiotique est conférée par la présence de la néomycine phosphotransférase exprimée par le gène *nptII* situé lui aussi sur l'ADN-T. Bien que résistantes à l'antibiotique, la présence de *nptII* au sein de l'ADN génomique des différentes plantes potentiellement transformées sera également vérifiée.

La caractérisation moléculaire passe par une étape préliminaire essentielle à savoir l'extraction de l'ADN génomique. Cette étape est dépendante, entre autres, de la quantité de plante disponible. L'inconvénient des cultures *in vitro* est la faible quantité de matériel vivant que l'on peut obtenir en comparaison à des plantes cultivées en sol. Parmi les 49 individus, certaines plantes présentent un phénotype de croissance très lente qui ne nous a pas permis d'obtenir suffisamment de matériel végétal. Sur les 49 transformants disponibles nous nous sommes alors focalisés sur 28 d'entre eux. L'extraction de l'ADN génomique de ces 28 individus faciles à multiplier s'est faite en suivant les recommandations décrites dans la partie matériel et méthodes. En effet, c'est l'utilisation d'un kit d'extraction commercial qui s'est révélé être le seul efficace pour avoir de l'ADN suffisamment pur. L'expérience nous a montré que la présence de polysaccharides et/ou de métabolites secondaires pouvait entraîner un dysfonctionnement des enzymes utilisées au cours des expérimentations de biologie moléculaire (*Taq* DNA polymérase).

Le fait que toutes nos plantes se soient parfaitement bien développées en culture *in vitro* sur milieu sélectif enrichi en kanamycine était un bon indicateur de leur état de transformation. Toutefois, l'acquisition de cette résistance à l'antibiotique ne permet pas d'attester de la réussite de l'évènement de transformation. En effet, par échappement, certains individus ont la capacité de résister naturellement à la concentration de kanamycine présente dans le milieu sélectif. Rappelons que la dose optimale d'antibiotique utilisée pour permettre de sélectionner les plantules transformées a été déterminée par Lièvre et col. (Lièvre *et al.* 2005). Cette concentration est de 75 µg/ml de kanamycine.

Pour confirmer la présomption selon laquelle les plantes sélectionnées ont bel et bien incorporé l'intégralité de l'ADN-T, et donc le transgène, deux types d'amplification par PCR ont été réalisés. La première consiste à mettre en évidence la présence du gène *nptII*, et la seconde celle du gène *cyp73A32* codant pour la C4H de rue apportée par l'ADN-T. Toutefois, l'utilisation d'amorces internes au gène *cyp73A32* n'est pas possible. En effet, réaliser une PCR avec de telles amorces conduirait à amplifier le gène *cyp73A32* endogène de manière systématique. Afin de révéler uniquement l'intégration du transgène qui est sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV, nous avons utilisé une amorce sens s'hybridant au promoteur et une amorce reverse s'hybridant au gène codant pour CYP73A32.

La mise en évidence du gène de sélection *nptII* a été réalisée par PCR en utilisant les amorces NptDIR 5'-ATTGAACAAGATGGATTGCAC-3' et NptREV 5'-TCGTCAAGAA GGCGATAGAA-3' s'hybridant spécifiquement à 58°C. La mise en évidence du transgène 35S::*cyp73A32* a été réalisée par PCR en utilisant les amorces 35SDIR100 5'-CACTATCC TTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAA-3' et C4HRueREV500 5'-GCCTGGGGGT CTTTCTTCACATCCTCGA-3' s'hybridant spécifiquement à 65°C. Après amplification, chaque échantillon est analysé sur un gel d'agarose à 1,5%. Les tailles attendues sont de 600 et 790 pb respectivement pour le gène codant pour la C4H et le gène *nptII*. Pour éviter un biais expérimental, chaque plante a été analysée plusieurs fois. Afin de vérifier la spécificité de l'amplification, toutes les expérimentations ont été réalisées avec des témoins négatifs (ADN génomique de rue sauvage et eau) et un témoin positif (plasmide pBIN-73A32 Cf matériel et méthodes). Les résultats d'amplification pour chaque plante supposée transformée sont résumés dans le tableau 5.

Souche de <i>R. graveolens</i>			Souche de <i>R. graveolens</i>		
	<i>nptII</i>	<i>35S::CYP73A32</i>		<i>nptII</i>	<i>35S::CYP73A32</i>
K3.4.1	+	+	K5.31.1	+	+
K3.15.1	+	+	K5.32.1	+	+
K5.5.2	+	+	K5.32.2	+	+
K5.6.2	+	+	K5.32.4	+	+
K5.8.1	-	-	K7.3.1	+	+
K5.10.1	+	+	K7.3.4	+	+
K5.10.2	+	+	K7.8.1	-	-
K5.16.1	-	-	K7.11.1	+	+
K5.24.1	+	+	K7.21.1	-	-
K5.24.2	+	+	K7.22.1	+	+
K5.26.1	+	+	K7.25.1	+	+
K5.29.1	+	+	K7.37.1	+	+
K5.30.1	-	-	K7.38.1	+	+
K5.30.2	+	+	K7.40.1	+	+

Tableau 5 : Résultats de l'amplification des gènes *nptII* et *35S::cyp73A32* sur de l'ADN génomique extrait de feuilles de rue. (+) signifie que l'amplification a bien eu lieu et que l'amplicon est de taille attendue. (-) signifie qu'il n'y a pas eu d'amplification.

Les résultats obtenus démontrent que sur les 28 individus testés il n'y en a que 23 qui sont réellement transformés. A ce stade, il nous semblait possible que l'utilisation de la seule amplification par PCR des transgènes pour attester de leur intégration dans le génome de la plante était discutable. En effet, elle pouvait signifier la présence d'agrobactéries recombinantes résiduelles ayant le plasmide pBIN-73A32 suite au protocole de transformation. Or, le mode de multiplication végétatif que nous utilisons est basé sur le prélèvement de la partie apicale qui est ensuite repiquée sur un nouveau milieu nutritif. Cette

précaution limite fortement la dissémination d'une quelconque contamination au cours des repiquages successifs. Cependant, pour nous affranchir d'un risque de contamination et pour infirmer cette hypothèse, des feuilles de rue ont été placées dans un milieu de culture bactérien YEB liquide (Cf matériel et méthodes) afin de vérifier qu'aucune bactérie ne se développe. L'ensemble des tests réalisés s'est révélé négatif (résultats non montrés), ce qui signifie qu'aucune plante n'était contaminée par des bactéries. Les différentes plantes testées sont donc génétiquement transformées.

Une analyse complémentaire par un southern blot permettrait de déterminer le nombre exact de copies de transgène présent dans le génome de chaque transformant. Malgré la caractérisation de certaines plantes par cette technique au cours de la thèse de Karine Lièvre, beaucoup de tentatives ont été infructueuses. En effet, le problème du southern blot est la nécessité d'une grande quantité d'ADN génomique, ce qui implique une production de beaucoup de matériel végétal. La connaissance du nombre de transgènes ne nous aurait pas apporté beaucoup d'information supplémentaire. Nous nous sommes donc volontairement limité à une caractérisation moléculaire par PCR.

1.3 Dosage de la teneur en furocoumarines des transformants K-73A32

Ruta graveolens contient 3 furocoumarines majeures qui ont été dosées chez l'ensemble des transformants K-73A32. Le psoralène, le 8-MOP et le 5-MOP sont extraits de feuilles lyophilisées avec une solution hydro alcoolique (50 : 50), puis sont dosés par HPLC. La méthode utilisée est basée sur une séparation en phase inverse décrite dans le chapitre matériel et méthodes. L'identification des composés repose sur une comparaison avec des spectres UV de molécules étalons.

Chaque transformant a subi deux prélèvements de matériel végétal pour l'extraction de furocoumarines. Pour vérifier la véracité des résultats, les deux prélèvements ont été réalisés à des périodes différentes espacées de 6 mois (octobre 2004 et février 2005) sur des plantes qui

ont été repiquées entre temps sur de nouveaux milieux nutritifs. Le second prélèvement a été partagé en deux : une partie a été utilisée pour l'évaluation de la teneur en furocoumarines, le second a servi à l'extraction des ARN totaux (ARNs qui ont permis la quantification des transcrits correspondant au gène codant pour la C4H). Le fait de réaliser ces deux prélèvements en même temps, sur la même plante, nous a permis de corrélérer la concentration en furocoumarines au niveau d'expression du gène *cyp73A32*. Le dosage des furocoumarines par HPLC a été répété plusieurs fois. Afin d'avoir des résultats comparables, nous avons, lors d'une même série, analysé des extraits de rues témoins et de rues transgéniques. De plus, chaque échantillon est dupliqué afin de vérifier le bon fonctionnement de l'appareillage et de vérifier toute valeur pouvant sembler anormale.

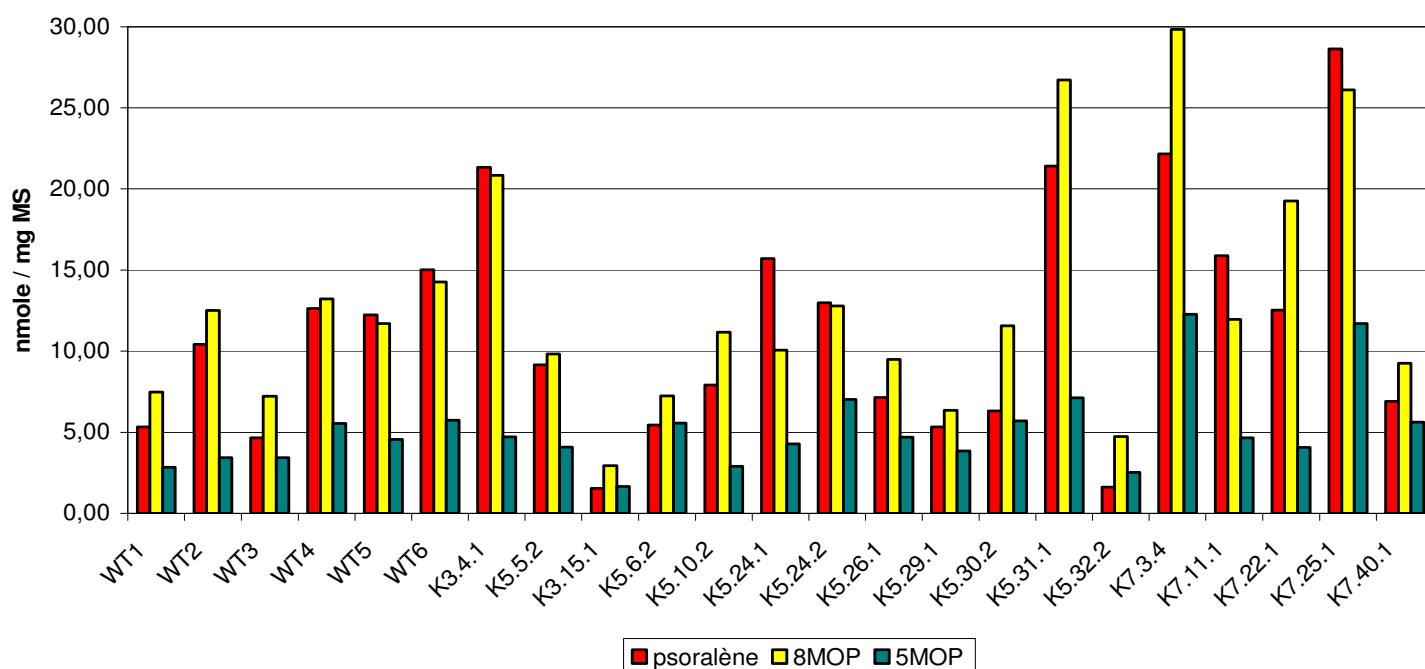


Figure 23 : Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rue témoin sauvage (WT) et de rue transgénique (K.) avec le gène codant pour la C4H de *R. graveolens*. Les résultats sont exprimés en nmole par mg de matière sèche.

Les résultats que nous avons obtenus sont décrits sur la figure 23 et correspondent à un dosage de la teneur en furocoumarines chez 6 plantes non transformées (WT pour Wild Type) et chez 17 transformants (série K.). Une analyse statistique a été effectuée. Nous avons réalisé un test T bilatéral de Student pour déterminer dans quelle mesure les deux échantillons sont susceptibles de provenir de deux populations sous-jacentes ayant la même moyenne. Les

moyennes, écarts types et les résultats sur test T des deux populations sont représentés graphiquement sur la figure 24.

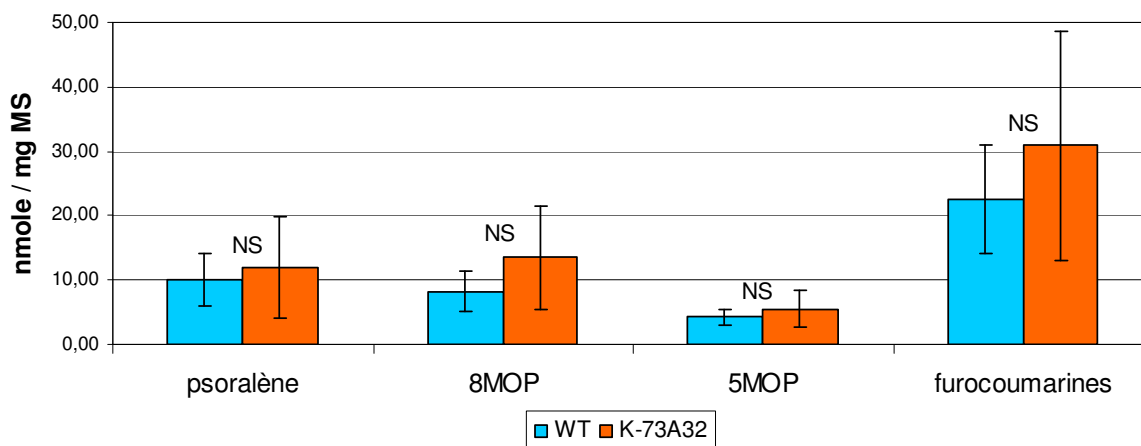


Figure 24 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines (valeurs cumulées des trois précédents) dosées dans un échantillon de rues témoins (WT) ainsi que dans l'ensemble des rues transformées (K-73A32) avec le gène codant pour la C4H de *R. graveolens*. Les résultats sont exprimés en nmole par mg de matière sèche. NS : pas de différences significatives ($p=0,05$) entre les deux échantillons.

Les résultats des tests T réalisés sur le psoralène, le 8-MOP, le 5-MOP et l'ensemble des furocoumarines semblent indiquer que les deux échantillons appartiennent à deux populations ayant la même moyenne. La transformation génétique de rue avec la construction 35S::*cyp73A32* n'aurait donc pas d'incidence sur la production de furocoumarines même si on a l'impression que certaines plantes prises individuellement semblent produire plus de furocoumarines. Ces résultats nous ont semblé assez surprenants et nous ont amené à nous demander si le transgène *cyp73A32* était réellement surexprimé dans la plante. C'est pourquoi nous avons initié des expériences de PCR en temps réel qui devaient nous permettre de vérifier la présence d'ARNm spécifique de *cyp73A32*.

1.4 Quantification du nombre de transcrits C4H

Afin d'affiner les résultats décrits ci dessus, nous souhaitons corréler le niveau de production de furocoumarines avec le niveau d'expression du gène codant pour CYP73A32. Le transgène étant sous le contrôle d'un promoteur constitutif, on s'attendait à voir une augmentation significative du nombre de transcrits C4H chez les transformants K-73A32.

L'utilisation d'une approche de quantification du niveau d'expression d'un gène a nécessité de faire un certain nombre de mise au point. Il a fallu d'une part pondérer le niveau d'expression du transgène par rapport à un gène endogène. D'autre part il a fallu identifier des amorces spécifiques pour réaliser les PCR. Pour bien comprendre l'importance cruciale de ces choix (gène rapporteur et des amorces), il convient ici de rappeler les étapes majeures d'une PCR en temps réel.

1.4.1 Introduction à la PCR en temps réel : justification du choix du gène rapporteur

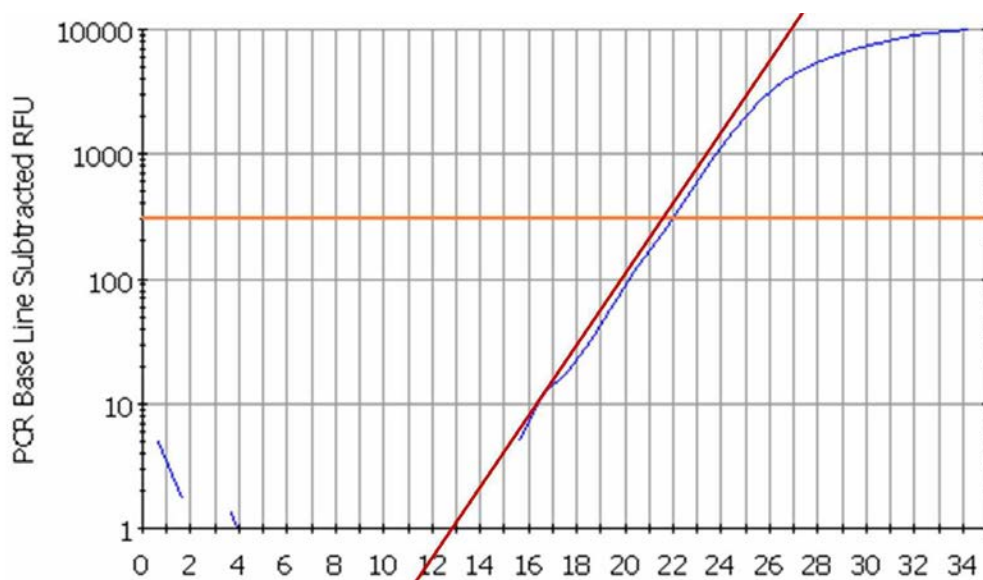


Figure 25 : Cinétique complète d'une réaction de polymérisation. En ordonnée, les données de fluorescence sont exprimées en logarithme. De 20 à 1500 RFU la phase exponentielle prend une apparence linéaire. En abscisse, les unités correspondent au nombre de cycle.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée grâce à un marqueur fluorescent : le SYBR GREEN. L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible que l'on a dans l'échantillon de départ. Les données de fluorescence sont exprimées en logarithme afin d'identifier facilement la phase exponentielle et mesurable qui prend alors une apparence linéaire (Figure 25). Cette partie permet de calculer la quantité d'ADN initial après détermination du nombre de cycles (Ct) nécessaires pour atteindre une quantité arbitraire de fluorescence.

L'approche que nous avons choisie ne consiste pas à quantifier de manière absolue le nombre de transcrits présents dans un organe donné, mais à comparer le niveau transcriptionnel d'un gène donné entre plantes transformées et plantes témoins. En effet, pour avoir un élément de comparaison fiable entre chaque individu, il nous fallait apporter exactement la même quantité d'ADNc au mélange réactionnel initial. Sachant que, expérimentalement, il est difficile de respecter cette stricte équimolarité entre tous les échantillons, la solution permettant de diminuer les erreurs de manipulation était de comparer le niveau d'expression du gène d'intérêt au niveau d'expression d'un gène exprimé constitutivement et de manière homogène dans toutes les cellules de la plante. Afin d'éviter tout biais expérimental qui aurait pu survenir lors de l'extraction d'ARN ou lors de la synthèse des ADNc, on calcule pour chaque échantillon le ratio des Ct (nombre de cycles) entre le gène d'intérêt et le gène rapporteur. C'est ce ratio qui sera comparé entre plantes transformées et plantes sauvages. Les valeurs des Ct sont inversement proportionnelles à la quantité d'ADN initial.

Ruta graveolens n'étant pas une plante modèle dans la communauté scientifique, relativement peu de séquences étaient disponibles dans les banques de données informatiques. Parmi les différents gènes dont la séquence était accessible, nous avons choisi d'utiliser comme étalon interne un gène codant pour l'ARN ribosomal 26S (NCBI gene accession number : AY128176).

1.4.2 Introduction à la PCR en temps réel : choix des amorces

Le choix des amorces est également primordial pour effectuer des amplifications convenables avec une approche par PCR en temps réel. En effet il est important d'avoir des amorces spécifiques (T_m proche de 72°C) et très courtes encadrant des séquences de l'ordre de la centaine de paires de bases. Ces amorces ne doivent pas former de dimères d'amorces ni d'hybridations aspécifiques avec une séquence quelconque du génome au cours des cycles d'amplification. Pour chaque paire d'amorces des tests préliminaires sur plusieurs échantillons d'ADNc de rues témoins ont été effectués afin de vérifier, que ces deux conditions sont bien vérifiées.

a) La spécificité des amorces se détermine expérimentalement en réalisant une courbe de fusion en PCR en temps réel. La courbe de fusion en fin de quantification, permet de vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié. En effet, une courbe polymodale peut signifier un appariement aspécifique ou une formation de dimère d'amorces. Lorsque la courbe est unimodale (Figure 26), le calcul de la dérivée primaire de celle-ci donne une courbe en cloche dont l'abscisse du maximum est la température de fusion (T_m) du produit de la PCR (amplicon). La T_m est définie comme étant la température pour laquelle 50% des molécules d'ADN sont désappariées.

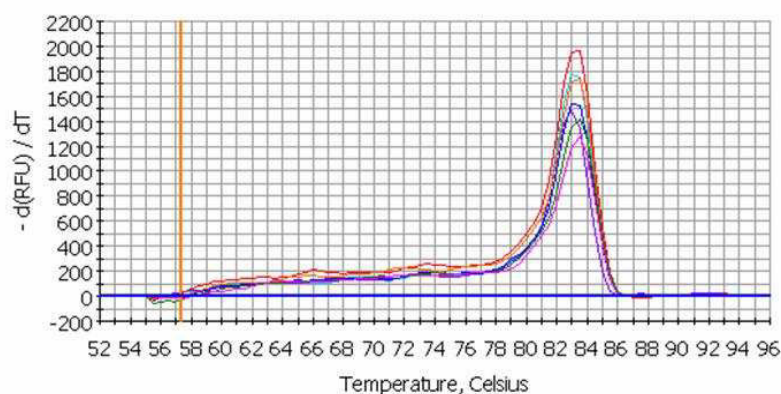


Figure 26 : Courbe de fusion unimodale.

Après plusieurs essais, nous avons obtenu des amorces satisfaisantes permettant l'amplification d'une séquence du gène rapporteur 26S, ainsi que l'amplification d'une séquence du gène *cyp73A32*.

b) L'efficacité d'une amplification correspond à la capacité d'augmenter le nombre d'amplicons à chaque cycle. Lorsqu'elle est de 100% cela signifie qu'à chaque cycle le nombre d'amplicons est multiplié par 2. L'efficacité de PCR pour une paire d'amorces donnée est généralement déterminée grâce à une droite d'étalonnage. Pour réaliser cette droite, dont le coefficient de corrélation doit s'approcher le plus possible de 1, nous avons réalisé une cascade de dilutions au quart de la matrice. Arbitrairement, on admettra que la dilution au $1/256^{\text{ème}}$ correspond à une unité de quantité de transcrit.

La droite d'étalonnage se rapportant au couple d'amorces C4H (coefficient de corrélation de 0,9997) nous permet de calculer l'efficacité de l'amplification qui est de 82,29%. Celle se rapportant au couple d'amorces 26S (coefficient de corrélation de 0,9947) nous permet de calculer une efficacité de 87,03%.

Après avoir réalisé ces différents tests, nous avons choisi les couples d'amorces 26Sdir ; 26Srev et RtC4Hfor1 ; RtC4Hrev1 (tableau 6) pour amplifier respectivement une partie de l'ARN ribosomal et une partie interne du gène *cyp73A32*. Les amorces ont été commandées de sorte à satisfaire le niveau de qualité nécessaire à ce type d'expérimentation (l'absence d'acétonitrile est essentielle contrairement à des amorces utilisées dans le cadre de PCR plus classiques).

Amorce	séquence
26Sdir	5'-GGGCGAAGCCAGAGGAAAC-3'
26Srev	5'-ACGAACGATTTGCACGTCAGT-3'
RtC4Hfor1	5'-TCAAATCACCGAGCCTGACA-3'
RtC4Hrev1	5'-CATCCTGAGGCGGAGAGTCT-3'

Tableau 6 : amorces utilisées en PCR quantitative.

1.4.3 Comportement du gène C4H au niveau transcriptionnel

Afin d'attester de la fiabilité des résultats, chaque PCR a été effectuée plusieurs fois. D'autre part, pour garantir la validité de notre expérimentation, un duplicata a été réalisé pour chaque échantillon. Ne pouvant réaliser que 96 analyses à la fois, nous avons effectué nos expérimentations sur 6 plantes témoins et 17 transformants. Enfin, nous avons choisi de considérer qu'un échantillon n'était pas exploitable dès que la différence des Ct d'un duplicata s'écarte de plus de 3% de leur valeur moyenne.

Les résultats que nous avons obtenus sont décrits sur la figure 27. La moyenne des Ct de chaque duplicata est réalisée pour chaque type d'amplification. Etant donné que le Ct est inversement proportionnel à la quantité de transcrits présent dans l'échantillon de départ, le ratio $Ct(26S)/Ct(C4H)$ permet la mesure du niveau relatif d'ARNm C4H de chaque plante analysée (Figure 27). Nous avons également effectué un test de comparaison de moyenne entre plantes témoins et les plantes transgéniques.

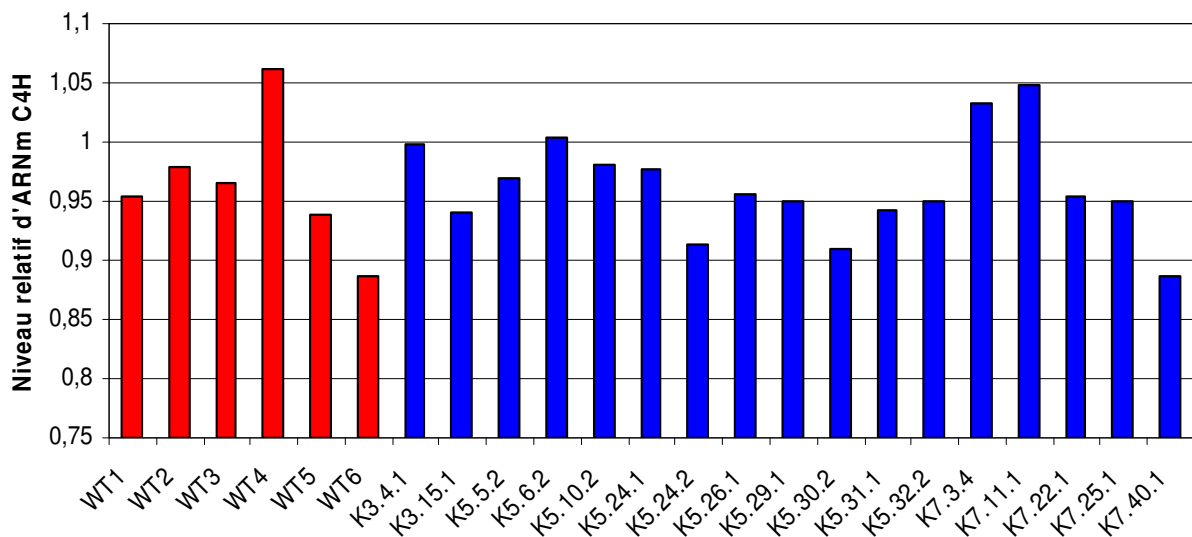


Figure 27 : Niveaux relatifs de transcrits C4H obtenus par analyse en RT-PCR en temps réel pour un échantillon de rues témoins (WT) et les plantes transgéniques K-73A32 (K.).

Comme on peut le constater, l'ensemble de nos résultats (répétitions non montrées) indique qu'il n'y a pas de différence significative ($p=0,05$) des niveaux relatifs de transcrits

C4H entre les plantes génétiquement transformées et les plantes témoins. Ces résultats assez surprenants vont dans le sens des observations faites sur les teneurs en furocoumarines. Le gène codant pour la C4H de rue étant placé sous le contrôle du promoteur 35S, on aurait pu s'attendre à une forte surexpression. Au vu de ces résultats, nous nous sommes alors demandé si notre protocole expérimental avait la capacité de détecter une augmentation/diminution du nombre de transcrits C4H. Pour vérifier cela, nous avons réalisé une PCR en temps réel à partir de matériel génétique prélevé sur des plantes ayant un niveau transcriptionnel du gène *cyp73A32* différent. Des auteurs ont montré que, dans des cellules soumises à un stress (lumière, blessure, infection par des pathogènes), la régulation de l'activité C4H est essentiellement de nature transcriptionnelle. Il en résulte une accumulation d'ARNm *cyp73A32*. (Mizutani *et al.* 1997 ; Weisshaar and Jenkins 1998 ; Betz *et al.* 2001 ; Ro *et al.* 2001)

Nous avons exploité cette propriété des C4H chez la rue dans le cadre d'une réponse à un stress UV. Expérimentalement, une rue sauvage cultivée en terre dans un phytotron a été exposée aux UV ($\lambda = 254$ nm) durant 15 minutes, à 50 cm de la source UV. La plante a été préalablement cultivée en phytotron et n'a pas subi d'autre stress. Du matériel végétal (feuilles) a été prélevé, congelé dans de l'azote liquide puis stocké au congélateur, à T0, T8, T24, et T48 heures après l'exposition aux UV. En parallèle, des témoins négatifs ont été réalisés aux mêmes temps sur une rue non exposée aux UV. Afin de mesurer le niveau transcriptionnel du gène *cyp73A32*, une extraction d'ARN totaux a été réalisée sur chacun des prélèvements. Une analyse du niveau d'expression de *cyp73A32* a été effectuée et les résultats obtenus sont décrits dans la figure 28.

Suite à l'exposition aux UV, on constate une augmentation du nombre de transcrits C4H, qui retournent à un niveau normal au bout de 48 heures. Cette augmentation a été observée en utilisant le gène ribosomal comme gène référent. Les résultats vont donc dans le sens de ceux décrits dans la bibliographie, ce qui montre notre capacité à détecter les variations du nombre de transcrits C4H. Cela rend donc légitime l'utilisation du gène 26S pour l'analyse du niveau de transcription de *cyp73A32*.

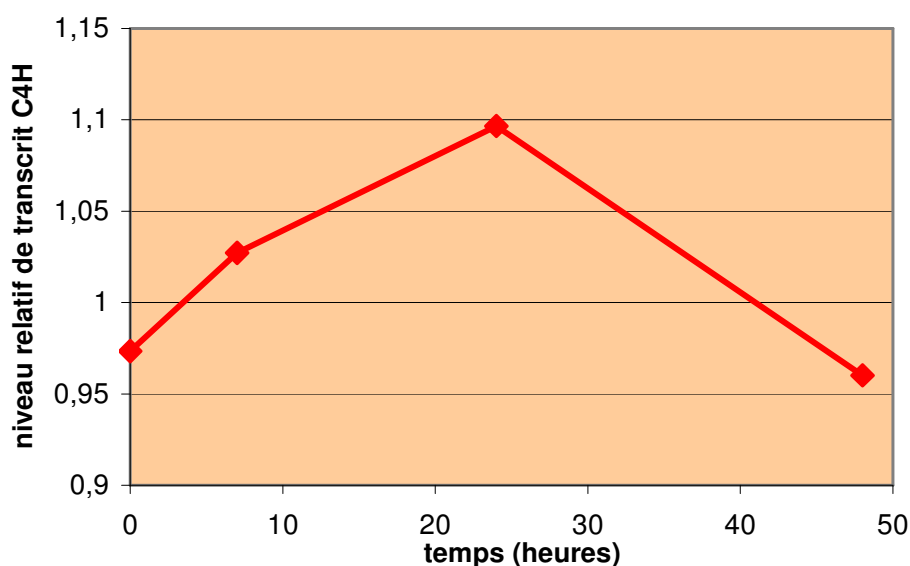


Figure 28 : Evolution de la quantité relative de transcrits C4H suite à une exposition aux UV ($\lambda = 254$ nm) de 15 minutes.

En conclusion, les expérimentations menées jusque là n'ont montré aucune différence significative, ni entre les teneurs en furocoumarines des deux populations de rues, ni entre les ratios Ct(26S)/Ct(C4H) des plantes transformées et des plantes témoins.

2 Transformants S-98A22

Les P450 de la famille des CYP98 codent pour des C3'H qui interviennent en amont de la voie des lignines (Figure 29). Nous avons caractérisé *in vitro* CYP98A22, qui dispose d'une activité C3'H sur les esters de shikimate uniquement (Hehn 2007), contrairement à CYP98A3 qui métabolise les esters de shikimate et quinate (Schoch *et al.* 2001). Les travaux de Franke (Franke *et al.* 2002b) et Abdulrazzak (Abdulrazzak *et al.* 2006) ont montré l'importance de la C3'H dans le développement cellulaire et la croissance des plantes, *via* la synthèse de précurseurs phénoliques. En se basant sur ces études, nous avons alors décidé d'étudier l'impact de la modulation de l'expression de l'activité C3'H sur l'ensemble de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Nous avons émis l'hypothèse qu'une stimulation générale de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes pourrait conduire à une augmentation de la teneur en furocoumarines. Etant donné que les plasmides pBIN utilisés

dans le cadre des transformations génétiques de plantes sont de taille assez importante (13kb) et que les clonages sont souvent longs et fastidieux, nous avons choisi de construire un plasmide qui permet l'utilisation de la technologie Gateway® (Cf matériel et méthodes) commercialisée par Invitrogen. Ce plasmide générique devait nous servir pour toutes les constructions ultérieures.

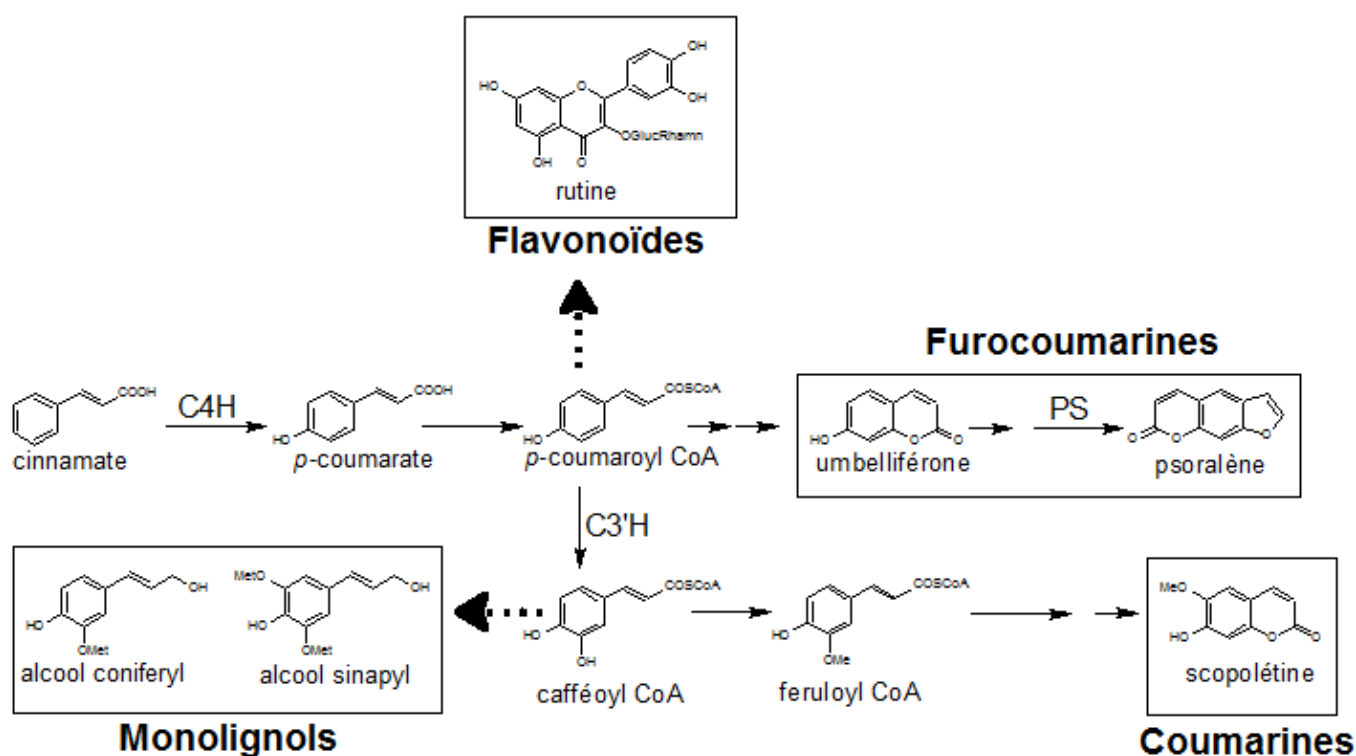


Figure 29 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase ; C3'H : ester de Coumaroyl 3'-Hydroxylase ; PS : Psoralène synthase.

2.1 Construction du plasmide pBIN-GW

Le plasmide pBIN-GW est un plasmide de destination Gateway® que nous avons obtenu par clonage de la cassette de recombinaison RfB au niveau du site de restriction *Bam*HI du plasmide pBIN-link. Le protocole utilisé pour réaliser ce clonage est celui décrit dans la partie « construction d'un vecteur de destination Gateway® » du chapitre matériel et méthodes. Après insertion de la cassette de clonage dans le plasmide, des cellules ccdB sont transformées par choc thermique avec le mélange de ligation. Les colonies obtenues sont

prises en culture en milieu liquide permettant ainsi l'amplification du plasmide. La détermination de l'insertion et de l'orientation de la cassette de clonage dans le vecteur recombinant a été réalisée par digestion avec l'enzyme de restriction *PvuII*, le clonage de cette cassette pouvant se faire dans les deux sens. Les profils de digestions obtenus sont comparés aux profils théoriques attendus (Figure 30).

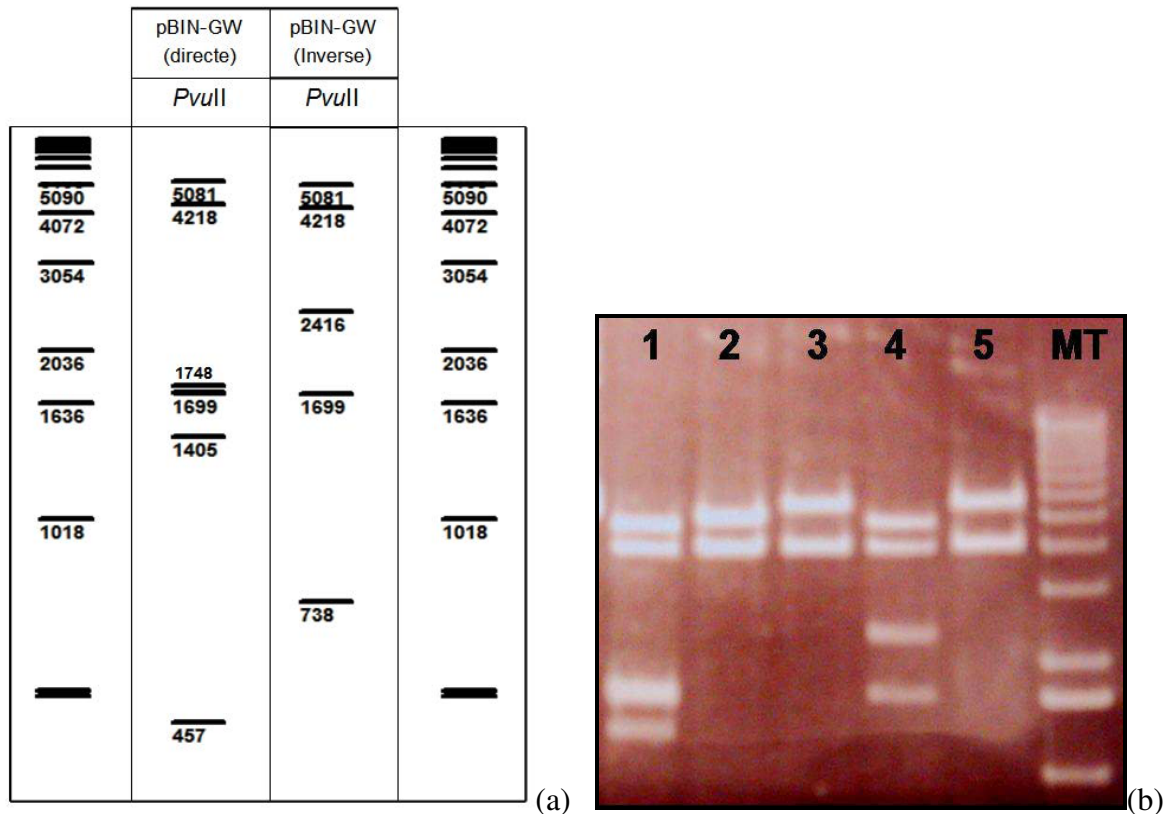


Figure 30 : (a) Profils de digestions théoriques des plasmides pBIN-GW obtenus en fonction de l'orientation de la cassette de recombinaison RfB, digérés par l'enzyme de restriction *PvuII*, comparés au marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). pBIN-GW (directe) est le plasmide ayant la cassette RfB dans la bonne orientation, et pBIN-GW (inverse) est le plasmide ayant la cassette RfB dans la mauvaise orientation. (b) Profils de digestions des supposés plasmides pBIN-GW digérés par l'enzyme de restriction *PvuII* (puits 1 à 5) comparés au marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). Les bandes de 457 et 738pb ayant migrées hors du gel ne figurent pas sur la photographie.

Les résultats obtenus indiquent que, pour la construction 1, le clonage de la cassette RfB est dans la bonne orientation, alors que pour la construction 4, le clonage s'est fait dans la mauvaise orientation. Les plasmides 2, 3 et 5 n'ont visiblement pas intégré la cassette de

clonage Le plasmide 1 a été réamplifié par transformation de cellules ccdB. Une carte de restriction de ce plasmide a été effectuée après différentes digestions (*Bgl*II, *Pvu*II et *Eco*RI), ce qui nous a permis de confirmer l'intégrité du plasmide pBIN-GW. Les profils obtenus décrits sur la figure 31b sont à nouveau comparés aux digestions théoriques (Figure 31a) et confirment l'identité du plasmide pBIN-GW.

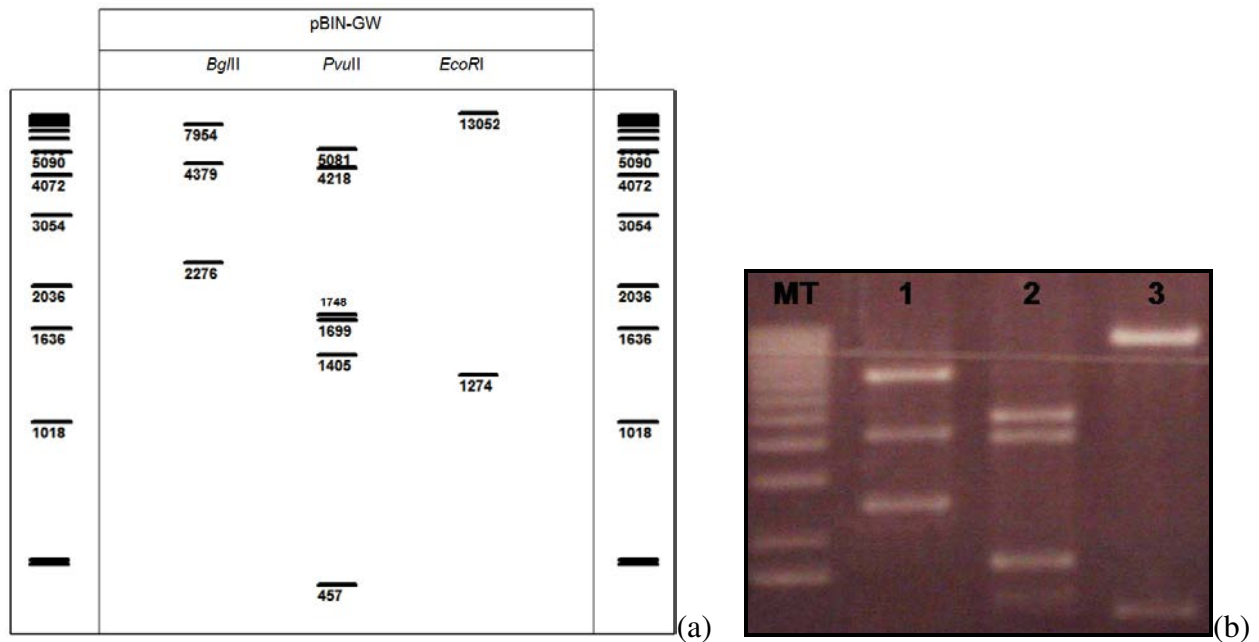


Figure 31 : (a) Profils de digestions théoriques du plasmide pBIN-GW digéré par les enzymes de restrictions *Bgl*II, *Pvu*II et *Eco*RI, comparés au marqueur de taille 1Kb DNA Ladder. (b) Profils de digestions du plasmide pBIN-GW digéré par les enzymes de restrictions *Bgl*II (puit 1), *Pvu*II (puit 2) et *Eco*RI (puit 3), comparés au marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). La bande de 457pb ayant migrée hors du gel ne figure pas sur la photographie.

2.2 Construction du plasmide pBIN-GW-98A22

L'ADNc du gène codant pour CYP98A22 a été amplifié à partir d'un plasmide pGEM-T-98A22 avec les amorces 98rueKpnIDIR2 5'-GGGGTACCATGGGTCTCCCACTCA TCCC-3' et 98rueKpnIREV 5'-GGGGTACCTTACAAATCAGCAGCAACACGTTT-3'. L'amplicon a été isolé sur gel d'agarose 1% et purifié avec le kit QIAEX II (Annexe 3). La ligation du produit d'amplification dans le plasmide pCR8®/GW/TOPO® est réalisée en

suivant les recommandations du fournisseur. Cette étape de clonage dans ce vecteur est nécessaire si on veut utiliser la technologie Gateway[®] pour réaliser le transfert du gène vers le plasmide de destination pBIN-GW. Avec le produit de ligation, une transformation de cellules TOP10 est effectuée, puis ces cellules sont étalées sur des boîtes LB contenant 50 µg/mL de spectinomycine. Les colonies bactériennes résistantes qui ont poussé sont mises en culture liquide dans un milieu sélectif et le plasmide amplifié est extrait avec le kit GenElute[™] Plasmid Miniprep Kit (Annexe 2). Les profils de digestion par l'enzyme de restriction *PvuII* obtenus sont comparés aux profils théoriques attendus (Figure 32).

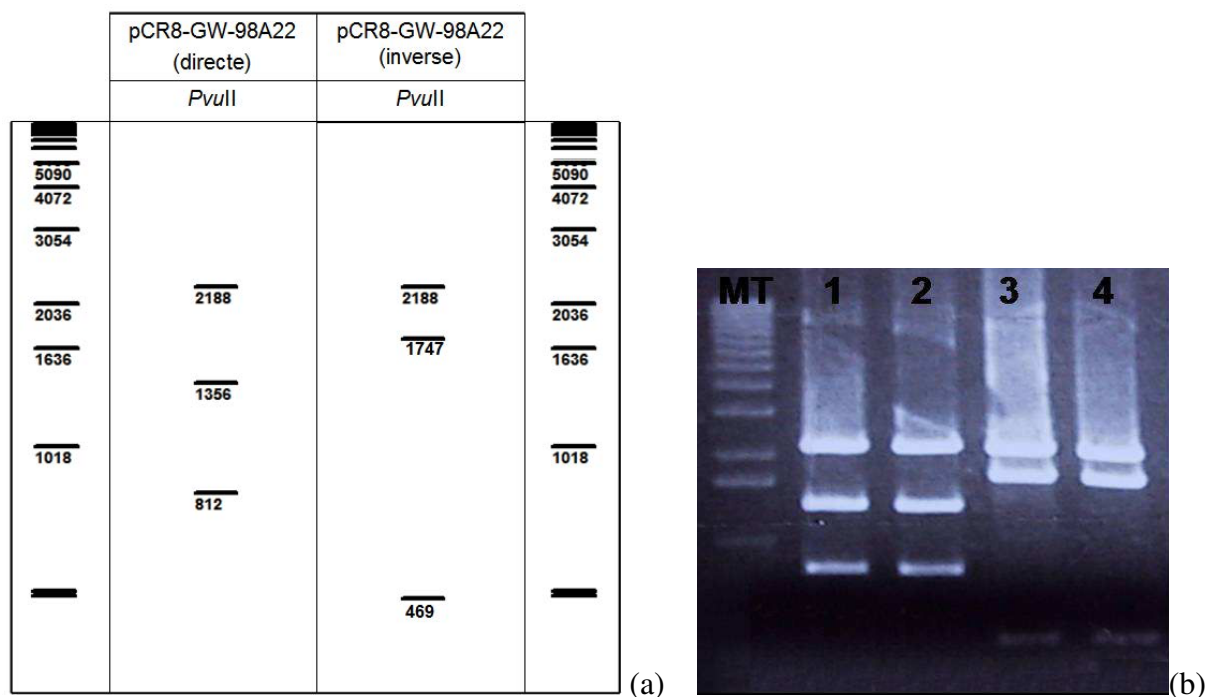


Figure 32 : (a) Profils de digestions théoriques des plasmides pCR8-GW-98A22 que l'on obtient en fonction de l'orientation du gène codant CYP98A22, digérés par l'enzyme de restriction *PvuII*, comparés au marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). pCR8-GW-98A22 (directe) est le plasmide ayant le gène dans la bonne orientation, et pCR8-GW-98A22 (inverse) est le plasmide ayant le gène dans la mauvaise orientation. (b) Profils de digestions des supposés plasmides pCR8-GW-98A22 digérés par l'enzyme de restriction *PvuII* (puits 1 à 4) comparés au marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Invitrogen).

Sur les quatre plasmides testés, les plasmides 1 et 2 présentaient un profil de restriction concordant avec le profil théorique. Les 2 plasmides ont été séquencés et il s'est avéré que la séquence du plasmide 2 contenait trop d'erreurs liées à l'amplification par PCR.

Il en résulte que seul le plasmide pCR8-GW-98A22-1 a pu être utilisé pour réaliser la suite de notre construction. A noter toutefois que le gène n'est pas totalement exempt de mutation. En effet, une mutation silencieuse au niveau du nucléotide 759 (codon 253) a été constatée.

La recombinaison du plasmide pCR8-GW-98A22-1 avec le plasmide pBIN-GW a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur. Des cellules TOP10 sont transformées avec le produit de recombinaison avant d'être étalées sur un milieu LB contenant 25 µg/mL de kanamycine. Quelques colonies sont mises en culture afin de réaliser une extraction d'ADN plasmidique avec le kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Annexe 2). L'intégrité du plasmide pBIN-GW-CYP98A22 (Figure 33) a été vérifiée par PCR. Comme pour la vérification de la transformation des transformants K-73A32, nous avons utilisé une amorce reverse interne au gène et une amorce directe s'hybridant au promoteur 35S. L'amorce 35SDIR100 5'-CACTATCCTTCGCAAGACCCTT CCTCTATATAAGGAA-3' s'hybridant spécifiquement au promoteur 35S du plasmide pBIN combiné à l'amorce 98rueKpnIREV 5'-GGGGTAC CTTACAAATCAGCAGCAACACGTTT-3' s'hybridant spécifiquement sur la séquence codante du CYP98A22 permet de vérifier que la recombinaison s'est bien faite : le gène est bien cloné et bien orienté dans le plasmide pBIN-GW.

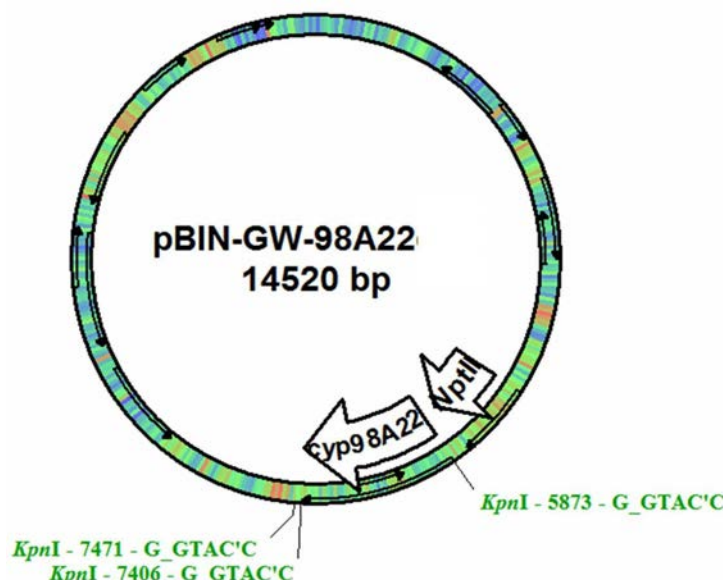


Figure 33 : Plasmide pBIN-GW-98A22

2.3 Obtention des transformants CYP98A22

Le protocole utilisé pour transformer des hypocotyles de rue est celui décrit dans le chapitre matériel et méthodes mais diffère sensiblement de celui utilisé par Lièvre (Lièvre *et al.* 2005). Ces différences résident dans l'ajout d'acétosyringone (125 μ M) en phase exponentielle de croissance de l'inoculum bactérien utilisé pour transformer les hypocotyles, et dans l'allongement du temps de culture des hypocotyles sur milieu de régénération (5 jours au lieu de 3 jours). L'ajout prématuré d'acétosyringone nous a semblé être pertinent, car la virulence et donc le transfert d'information génétique peuvent débuter plus précocément. L'allongement de la période de régénération permet d'accroître la résistance des hypocotyles aux stress qu'ils subissent lors de leur transfert sur milieu sélectif. Par ailleurs, afin de limiter l'assèchement des hypocotyles lors de leur prélèvement sous hotte à flux laminaire, nous avons limité le nombre d'explants mis en œuvre lors de la préparation d'une série de transformants. Ainsi, une centaine d'hypocotyles a été prélevée. Un phénomène caractéristique non observé jusque là a été mis en évidence au cours de l'étape de sélection des transformants S-98A22. Nous avons pu constater un bourgeonnement et une régénération accrue, ainsi qu'un renflement des hypocotyles (figure 34). Cette meilleure capacité de régénération de cellules transformées pourrait être la conséquence de l'activation générale de la voie des phénylpropanoïdes comme cela a déjà été constaté chez *Arabidopsis thaliana* (Franke *et al.* 2002b ; Abdulrazzak *et al.* 2006).

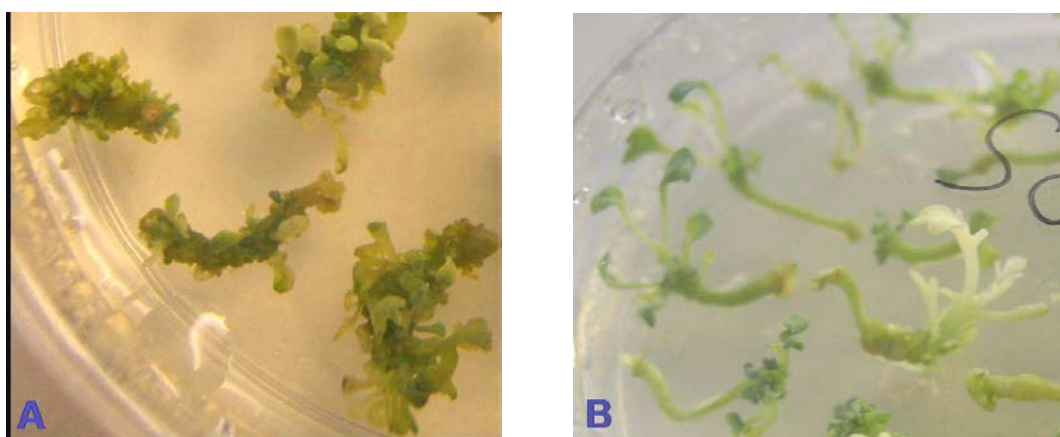


Figure 34 : (A, B) Hypocotyles de rue transformés génétiquement (sélection).

(A) : Transformation génétique réalisée avec la construction 35S::*cyp98A22*.

(B) : Transformation génétique réalisée avec la construction 35S::*cyp73A32*.

Les tiges feuillées d'environ 1 cm obtenues ont été ensuite repiquées sur un nouveau milieu sélectif pour une période minimale d'un mois. A l'issue de cette période, celles qui n'avaient alors pas blanchi ont été multipliées sur un milieu MS(30) sans pression de sélection (figure 35). A noter qu'au cours de ces repiquages, à l'ouverture des pots, une très forte odeur acre caractéristique des rues a été constatée, odeur beaucoup plus prononcée que pour des rues sauvages. Ces observations préliminaires nous ont laissé présager une modification notable dans le métabolisme secondaire des plantes transformées et peut être une teneur en furocoumarines supérieure à la normale. Aucun autre phénotype visible n'a été relevé.

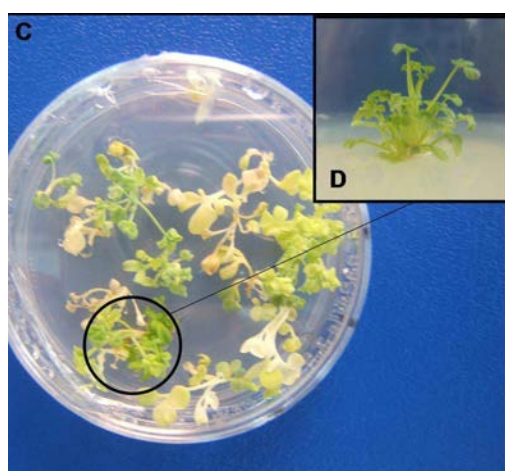


Figure 35 : Tiges feuillées sur milieu sélectif (C) avant repiquage en pot individuel (D).

Ces plantes repiquées résistantes à la kanamycine sont potentiellement transformées et possèdent donc en plus de leur gène codant pour CYP98A22 « naturel » au moins une copie de ce même gène sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV. 12 plantes ont été multipliées *in vitro* avant d'être caractérisées d'un point de vue moléculaire.

2.4 Caractérisation moléculaire des transformants S-98A22

La première étape de la caractérisation de ces plantes passe par la mise en évidence du transgène et du gène marqueur *nptII* au sein de l'ADN génomique. La présence de la néomycine phosphotransférase confère une résistance à la kanamycine et les plantes

génétiquement transformées doivent être capables de se développer sur un milieu sélectif. Néanmoins, cette résistance observée ne permet pas de certifier que la plante est réellement transformée génétiquement. Dans la mesure où il arrive que certains individus aient un niveau de tolérance naturellement élevé à l'antibiotique, la caractérisation moléculaire reste donc une étape nécessaire.

Contrairement aux transformants CYP73A32, aucun phénotype de croissance très lente n'a été observé et nous avons pu procéder à l'analyse génétique des 12 plantes kanamycine résistantes. Comme précédemment, l'extraction de l'ADN génomique a été effectuée avec le kit Plant DNeasy de Qiagen.

Afin de vérifier l'intégration de l'intégralité de l'ADN-T au sein du génome des plantes, deux types d'amplification par PCR ont été réalisées. La première consiste à mettre en évidence la présence du gène *nptII*, et la seconde, la présence du transgène *cyp98A22* codant pour la C3'H de rue. Pour les mêmes raisons que les transformants K-73A32, l'utilisation d'amorces internes ne permet pas la mise en évidence du gène *cyp98A22* issu de la transformation génétique. Afin de révéler uniquement l'intégration du transgène placé sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV, nous avons utilisé une amorce sens s'hybridant au promoteur 35S et une amorce reverse s'hybridant au gène *cyp98A22*. Comme pour les transformants K-73A32, la mise en évidence du gène *nptII* a été réalisée par PCR en utilisant les amorces NptDIR et NptREV. Celle du transgène 35S::*cyp98A22* a été effectuée par PCR en utilisant les amorces 35SDIR100 et 98rueKpnIREV. La présence de métabolites secondaires résiduels a parfois rendu les réactions de PCR aléatoire. C'est pourquoi, pour éviter tout biais expérimental, chaque plante a été analysée plusieurs fois, et pour chaque analyse un témoin positif (plasmide pBIN-GW-98A22 Cf matériel et méthodes) et deux témoins négatifs (eau et ADN génomique de rue sauvage) ont été réalisés. Après amplification, tous les échantillons ont été analysés sur un gel d'agarose à 1,5%, et les tailles attendus sont respectivement de 600 et 1600 pb pour le gène *nptII* et 35S::*cyp98A22*. Les résultats d'amplification sont résumés dans le tableau 7.

Souche de <i>R. graveolens</i>	<i>nptII</i>	<i>35S::CYP98A22</i>	Souche de <i>R. graveolens</i>	<i>nptII</i>	<i>35S::CYP98A22</i>
S.98A22.1	+	+	S.98A22.8	+	-
S.98A22.2	+	+	S.98A22.9	+	+
S.98A22.3	+	+	S.98A22.10	+	+
S.98A22.5	+	+	S.98A22.11	+	+
S.98A22.6	+	+	S.98A22.12	+	-
S.98A22.7	-	-	S.98A22.13	+	-

Tableau 7 : Résultats de l'amplification des gènes *nptII* et *35S::cyp98A22* sur de l'ADN génomique extrait de feuilles de rue. (+) signifie que l'amplification a bien eu lieu et que l'amplicon est de taille attendu. (-) signifie qu'il n'y a pas eu d'amplification.

Les résultats obtenus démontrent que parmi les 12 individus testés et potentiellement transformés, 8 le sont avec l'ADN-T inséré en entier, 3 ne le sont que partiellement (ne disposent que du gène *nptII*) et un seul ne l'est pas du tout. L'absence de bactéries recombinantes contaminantes a été vérifiée par incubation des feuilles dans un milieu de culture pour bactéries. Les cultures étaient toutes exemptes de contamination.

2.5 Dosage des phénylpropanoïdes

Les 3 furocoumarines majeures présentes chez *Ruta graveolens*, qui sont le psoralène, le 8-MOP et le 5-MOP, ont été dosées chez l'ensemble des transformants CYP98A22. Par ailleurs, ont également été analysés de manière qualitative, la rutine (un flavonoïde), le ferulate (précurseur de la lignine), l'umbelliférone et la scopolétine (coumarines). La méthode HPLC utilisée repose sur une séparation en phase inverse décrite dans le chapitre matériel et méthodes.

Afin d'attester de leur reproductibilité, les analyses HPLC ont été faites à deux moments différents (août et septembre 2006). Le second prélèvement a été scindé en deux : une partie a été utilisée pour réaliser l'extraction des composés phénylpropanoïdes. Le reste de l'échantillon a servi à l'extraction des ARNs totaux, ARNs qui ont permis la quantification des transcrits C4H et C3'H. Le fait de réaliser ces deux prélèvements en même temps, sur la même plante, nous permet de corréler la concentration en furocoumarines et des autres composés dosés qualitativement au niveau d'expression des gènes *cyp73A32* (C4H) et *cyp98A22* (C3'H). Toujours dans un souci de reproductibilité, chaque analyse a été effectuée plusieurs fois et dans tous les cas, chaque série a comporté des rues témoins et des rues transformées permettant une comparaison fiable des deux populations.

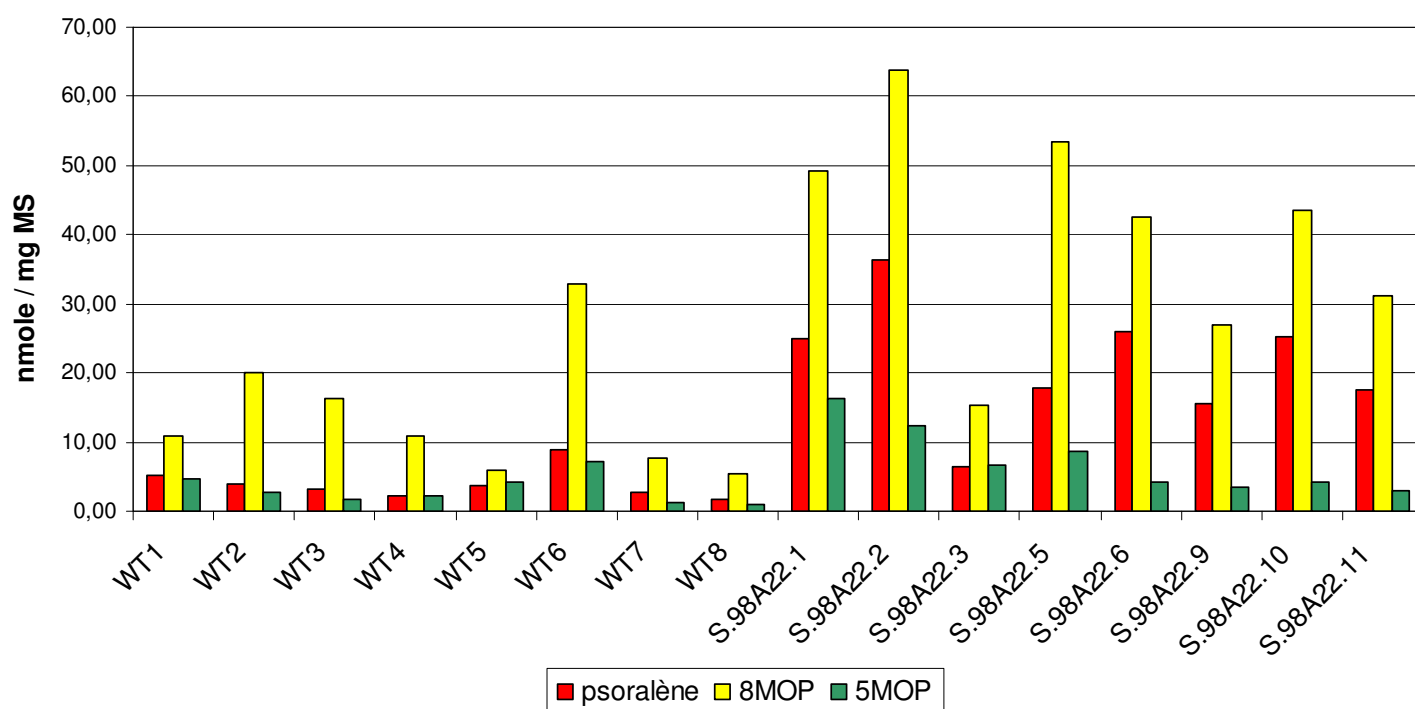


Figure 36 : Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rues témoins (WT) et de rues transformées (S-98A22) avec le gène codant pour la C3'H de *R. graveolens* exprimées en nmole par mg de matière sèche.

Les valeurs des teneurs en furocoumarines chez 8 plantes non transformées (WT) et chez 8 transformants (S-98A22) sont indiquées sur la figure 36. A titre d'exemple, un chromatogramme HPLC/DAD correspondant à l'analyse métabolique d'un transformant S-98A22 et d'une rue témoin est visualisé en figure 37. Ce chromatogramme montre, avant

analyse statistique des résultats, qu'il y a bien une différence très importante de la teneur en furocoumarines entre la plante témoin et le transformant analysés.

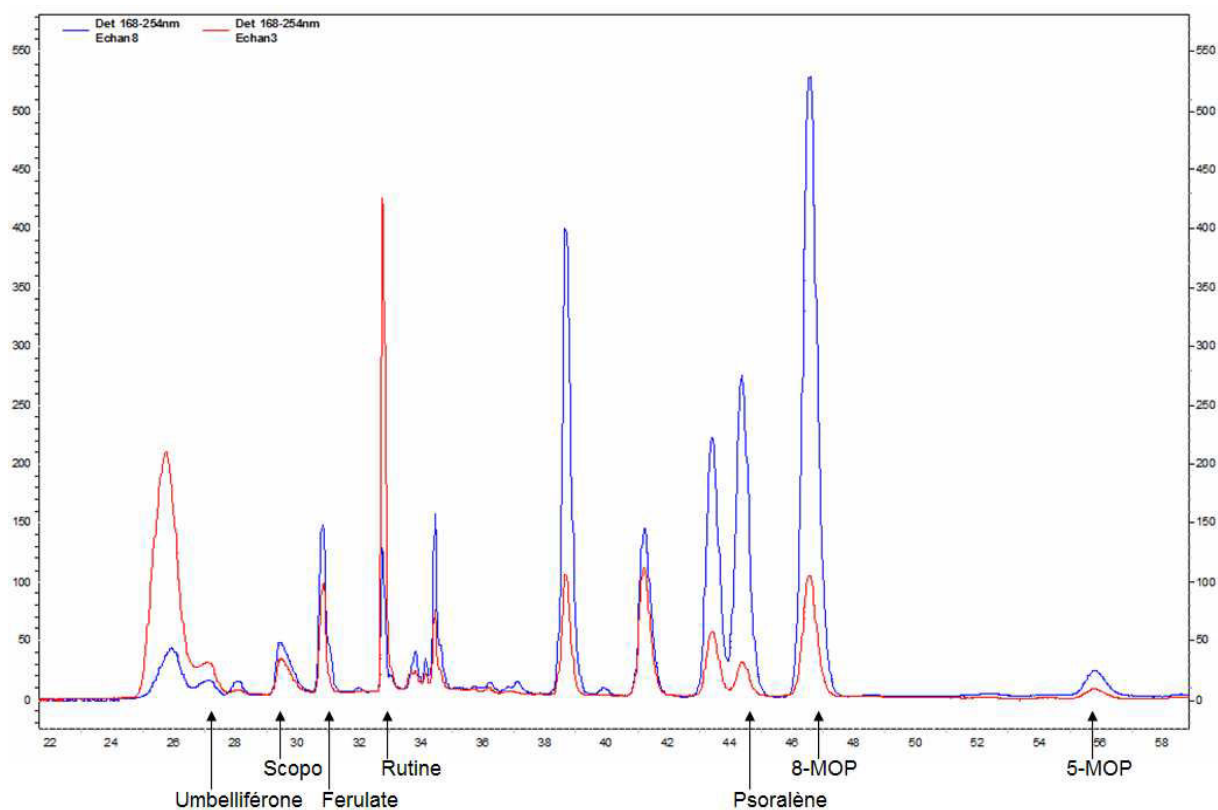


Figure 37 : Chromatogrammes HPLC/DAD (285nm) correspondants à l'analyse métabolique du transformant S-98A22-2 (en bleu, 46 mg de MS) et d'une rue témoin (en rouge, 42 mg de MS).

Ces analyses quantitatives ont été étendues à l'ensemble de la population testée. Un test de student a été effectué sur les données obtenues. Les moyennes et écarts types des deux populations sont représentés graphiquement sur la figure 38.

Sur l'ensemble des transformants on observe une très forte augmentation de la concentration en furocoumarines globale (3,5X). Les teneurs en psoralène, 8-MOP, et 5-MOP augmentent dans les mêmes proportions chez l'ensemble des plantes transgéniques. La transformation génétique de rue avec la construction *35S::cyp98A22* a donc une incidence hautement très significative sur la production de furocoumarines.

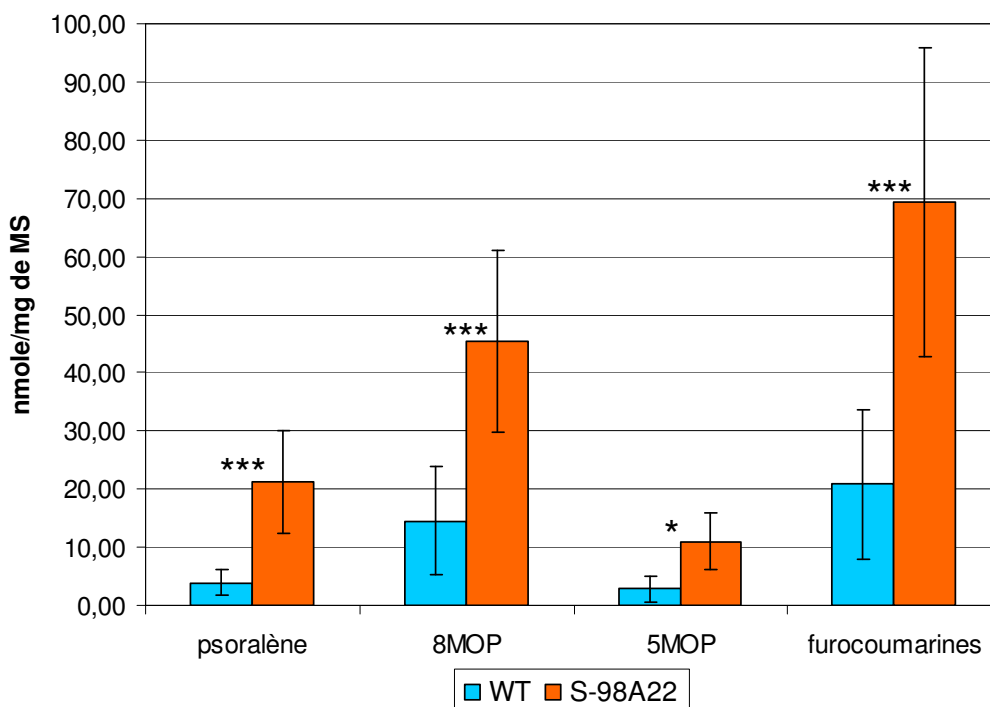


Figure 38 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines (valeurs cumulées) dosées dans un échantillon de rues témoins (WT) ainsi que dans l'ensemble des rues transformées (S-98A22) avec le gène codant pour la C3'H de *R. graveolens*. * : différence significative ($p < 0,05$) entre les deux échantillons.

Cette étude a été complétée par une analyse statistique des aires sous les pics correspondant à la rutine, au ferulate, à l'umbelliférone et à la scopolétine pour 8 plantes non transformées (WT) et pour 8 transformants (S-98A22). La représentation graphique simultanée de l'ensemble des phénylpropanoïdes analysés a nécessité l'utilisation d'une échelle exprimée en unités arbitraires. De ce fait, les valeurs de deux composés différents ne peuvent être comparées. Les résultats sont présentés sur la figure 39.

On constate une diminution significative d'un facteur 3 de la teneur en umbelliférone ainsi qu'une baisse d'un facteur 2 de la teneur en rutine chez les transformants S-98A22. La transformation génétique de rue avec la construction *35S::cyp98A22* influe de manière très significative sur la teneur en rutine et umbelliférone.

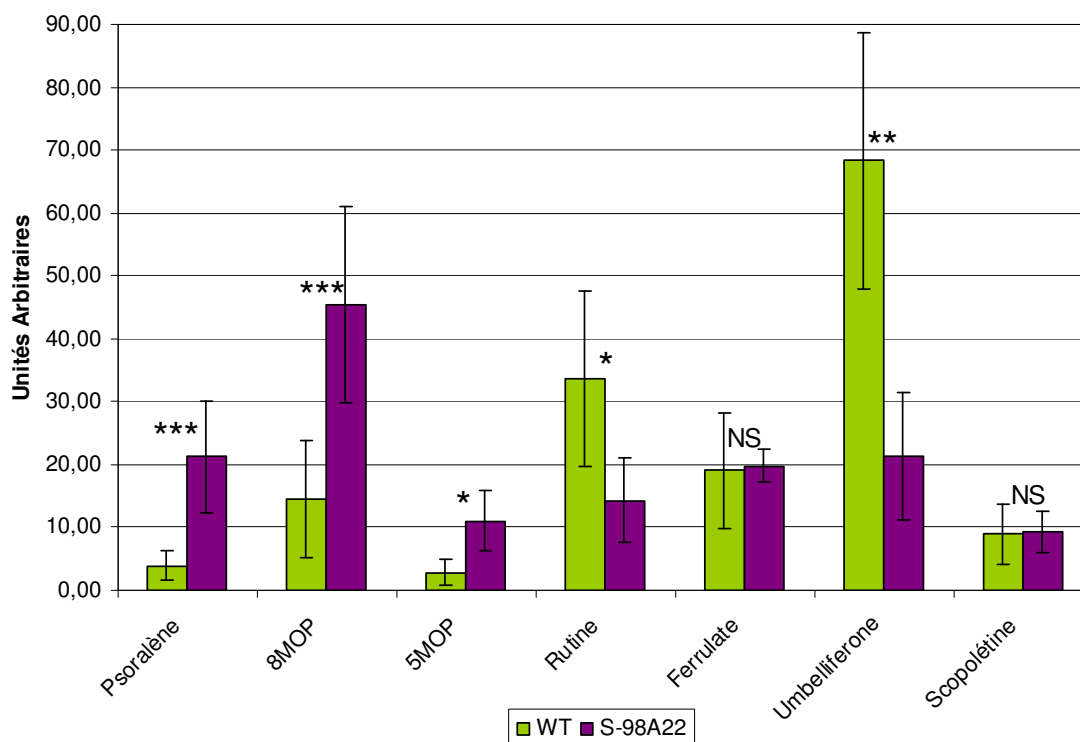


Figure 39 : Valeurs moyennes exprimées en unités arbitraires par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine dosés dans un échantillon de rues témoins (WT) ainsi que dans l'ensemble des rues transformées (S-98A22) avec le gène codant pour la C3'H de *R. graveolens*. * : différence significative ($p < 0,05$) entre les deux échantillons. ** : différence hautement significative ($p < 0,01$). *** : différence très hautement significative ($p < 0,001$). NS : pas de différence significative ($p = 0,05$).

Par contre, il ne semble pas se dégager de différences significatives entre les teneurs en ferulate et scopolétine des rues témoins et transgéniques. La surexpression du gène *cyp98A22* chez *R. graveolens* n'influe pas sur la teneur en ferulate et en scopolétine produites dans la plante.

2.6 Dosage des lignines

La C3'H est une enzyme placée en amont de la voie de synthèse des lignines, et n'intervient *a priori* pas dans la synthèse des furocoumarines (chapitre III paragraphe 2 Figure 29). De part sa localisation dans la synthèse des phénylpropanoïdes, il nous a semblé

nécessaire de réaliser une analyse fine de la composition en lignine. Le dosage des lignines a été réalisé par l'équipe du professeur Lapierre (INRA Paris-Grignon). Seuls deux transformants ont été analysés en triplicat afin de vérifier l'homogénéité des différentes tiges envoyées pour chaque échantillon.

Le rendement en monomères (Ar-CHSEt-CHSEt-CH₂SEt) issus des unités H, G et S liées seulement en β -O-4, est indiqué dans le tableau 8. Rappelons que seuls deux transformants ont été analysés afin de vérifier l'homogénéité des différents clones d'un même individu. La thioacidolyse a ainsi été réalisée sur les tiges de 4 rues témoins, de 3 transformants S-98A22.3 et 3 rues transgéniques S-98A22.6.

Echantillon	Rendement en μ moles /g MS				%H	%G	%S
	H	G	S	total			
Moyenne Rues sauvage	0.41	48	103	152	0.27	31.7	68.1
Ecart type	0.18	10	21	29	0.11	3.4	3.4
moyenne S-98A22.3	0.70	52	112	165	0.43	31.4	68.2
Ecart type	0.09	5	8	13	0.07	0.6	0.6
Moyenne S-98A22.6	0.35	49	86	135	0.25	35.9	63.9
Ecart type	0.10	11	20	31	0.03	1.7	1.7

Tableau 8 : Résultats de thioacidolyse de tiges de rues témoins (WT) et de deux individus transformés avec la construction 35S::CYP98A22.

Les analyses décrites dans le tableau 8 indiquent que les lignines de tiges de rue sont essentiellement constituées d'unités S (plus de 60%) et G (plus de 30%) et de quantités très mineures d'unités H (moins de 0.5%). Le rapport molaire S/G est d'environ 2. Ce chiffre assez élevé pour une plante herbacée suggère que les activités enzymatiques responsables de la formation des unités S (Ferulate 5-Hydroxylase, Catechol-O-Méthyl Transférase) sont élevées dans la tige de cette plante.

On constate également que le rendement en produits monomères est proche de 150 $\mu\text{moles} / \text{g}$ de matière sèche. Ce résultat suggère qu'il y a 5 à 10% de lignines dans ces tiges (1 gramme de lignines de dicotylédone génère 1500 à 2500 μmoles de produits).

Il est à noter que les répétitions biologiques (4 pour les témoins et 3 pour chaque transformant) présentent une variabilité assez marquée en terme de rendement. Cette variabilité peut s'expliquer par l'aspect un peu hétérogène des tiges, bien que le prélèvement se soit fait sur des plantes du même âge cultivées *in vitro* dans les mêmes conditions. Cette variabilité est toutefois plus faible pour les valeurs relatives (%G et %S).

Enfin, il ne semble pas se dégager de différence significative entre tiges témoins et transgéniques, malgré le pourcentage un peu plus élevé d'unités H (0.43% contre 0.25) dans le transformant S-98A22.3. Particularité qui est également retrouvé chez la plante témoin WT2. Les unités H sont à la fois très mineures dans les lignines, mais sont souvent le reflet d'un phénomène de stress ou d'une altération de la voie des phénylpropanes.

Ces premières analyses qui ont porté sur le dosage des unités H, G et S liées seulement en $\beta\text{-O-4}$ nous apprennent que chez la rue sauvage, les tiges de rue contiennent environ 10% de lignine qui est riche en unités S (plus de 60%) et en unité G (plus de 30%) alors que les unités H sont présentes en quantité très faible (moins de 0,5%). S'il y a un effet très net sur la synthèse des furocoumarines, il semblerait que la surexpression de CYP98A22 n'engendre pas de modifications de teneur et de composition en lignine.

2.7 Quantification du nombre de transcrits C4H et C3'H

Pour compléter et expliquer les résultats obtenus dans le cadre des analyses métaboliques, il nous fallait encore corréliser ces données avec l'expression des gènes codant pour CYP73A32 et CYP98A22. C'est pourquoi nous avons réalisé une analyse basée sur la RT PCR en temps réel.

2.7.1 Choix des amorces

Après avoir réalisé les différents tests adéquats (Cf paragraphe 1.4.1), nous avons choisi les couples d'amorces 26Sdir ; 26Srev, RtC4Hfor1 ; RtC4Hrev1 et RT98A22-DIR1 ; RT98A22-REV1 (tableau 9) pour amplifier respectivement une séquence de l'ARN ribosomal, du gène *cyp73A32* et du gène *cyp98A22*.

Amorce	séquence
26Sdir	5'-GGGCGAAGCCAGAGGAAAC-3'
26Srev	5'-ACGAACGATTTGCACGTCAGT-3'
RtC4Hfor1	5'-TCAAATCACCGAGCCTGACA-3'
RtC4Hrev1	5'-CATCCTGAGGCGGAGAGTCT-3'
RT98A22-DIR1	5'-GAGGTTGCACCCACCAACTC-3'
RT98A22-REV1	5'-CACCTATCTTGACGTTGGCGT-3'

Tableau 9 : amorces utilisées en PCR quantitative.

2.7.2 Comportement des gènes C4H et C3'H au niveau transcriptionnel

Nous avons choisi d'analyser 5 plantes témoins et 5 plantes transgéniques (S-98A22-2, 3, 4, 9 et 11). Après avoir extrait les ARN totaux avec le kit Qiagen RNeasy selon les modalités décrites dans le chapitre matériel et méthodes, une mesure fine du niveau transcriptionnel de l'ARN ribosomique 26S et des ARNm *cyp73A32* et *cyp98A22* a été réalisée par PCR quantitative. Toutes les analyses se sont faites en même temps et en doublon pour s'affranchir de tous biais expérimental. Les résultats correspondants aux transcrits C4H et C3'H de chaque plante analysée sont exprimés en quantité relative d'ARNm (Figure 40). Afin de montrer, le cas échéant, une différence significative du niveau relatif de transcrits

(*cyp73A32* ou *cyp98A22*) entre rues témoins et rues transformées S-98A22, un test de comparaison de moyenne a été réalisé.

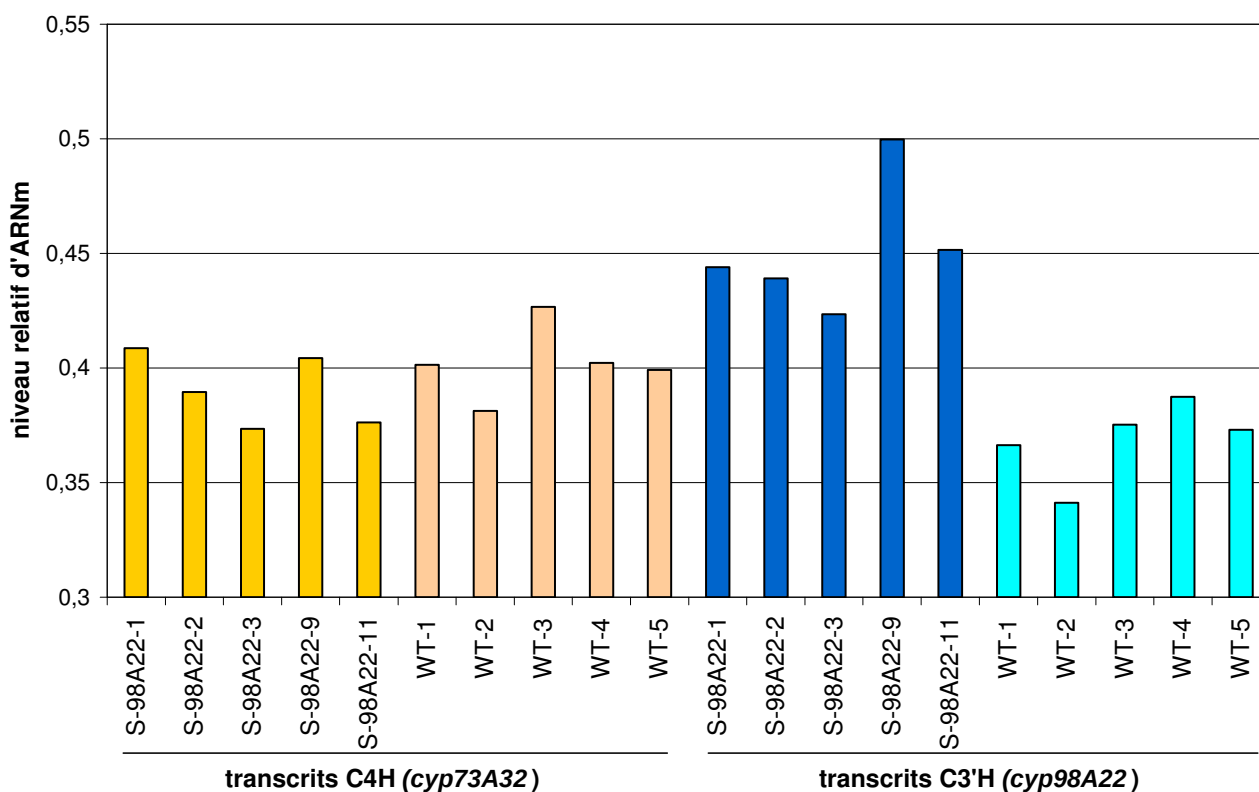


Figure 40 : Niveaux relatifs des transcrits C4H et C3'H (*cyp98A22*) obtenus par analyse en RT-PCR en temps réel pour un échantillon de rues témoins (WT) et de plantes transgéniques (S-98A22).

A partir des résultats obtenus pour le niveau relatif de transcrits C4H il ne semble pas se dégager de différences significatives entre les deux séries de plantes (témoins et transgéniques S-98A22). A l'inverse, le test T montre clairement une différence hautement significative ($p=0,0011$) du niveau relatif d'ARNm *cyp98A22* entre les rues sauvages et les transformants S-98A22. Cette différence est caractérisée par une augmentation du nombre de transcrits C3'H chez toutes les plantes transgéniques.

Pour conclure sur cette partie, il semblerait que les observations métaboliques (augmentation de la teneur en furocoumarines, diminution de la rutine et de l'umbelliférone), seraient les conséquences de la surexpression du gène *cyp98A22*.

3 Transformants S-98A3

Parallèlement aux travaux effectués sur la surexpression de *cyp98A22*, nous avons entamé la transformation de rue avec un gène orthologue, *cyp98A3*. En effet, *in vitro*, les deux enzymes disposent d'activités légèrement différentes (CYP98A22 métabolise uniquement les esters de shikimate (Hehn 2007) et CYP98A3 utilise les esters de shikimate et quinate (Schoch *et al.* 2001)). Nous nous sommes ainsi demandé si cette augmentation de la teneur en furocoumarines pouvait être imputée à la surexpression spécifique de la C3'H de *Ruta graveolens*. La séquence de la C3'H d'*A. thaliana* nous a été fournie par le docteur Werck-Reichhart (IBMP-CNRS, Strasbourg). Afin de travailler dans des conditions analogues à celle du S-98A22, nous avons reclone le gène *cyp98A3* dans le plasmide pBIN-GW.

3.1 Construction de pBIN-GW-98A3

Le gène codant pour CYP98A3 a été amplifié à partir du plasmide pB7W6G avec les amorces 98A3dirBAM 5'-GGGATCCATGTCGTGGTTTCTAATAGCG-3' et 98A3revECO 5'-GGAATTCTTACATATCGTAAGGCACGCG-3'. L'amplicon a été isolé sur gel d'agarose 1% et purifié avec le kit QIAEX II (Annexe 3). La ligation du produit d'amplification dans le plasmide pCR8®/GW/TOPO® a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Avec ce produit de ligation, une transformation de cellules TOP10 a été effectuée puis ces cellules sont étalées sur des boîtes LB sélectif. Les profils de digestions obtenus à partir des plasmides amplifiés digérés par les enzymes de restrictions *BglI* et *BamHI* sont comparés aux profils théoriques attendus (Figure 41).

La comparaison des profils de digestion des cinq plasmides aux profils théoriques nous indique que seuls les plasmides pCR8-GW-98A3-3 et -4 ont intégré le gène *cyp98A3* dans la bonne orientation. Ces échantillons ont été séquencés : après séquençage, aucune erreur de séquence n'a été mise en évidence par rapport à celle trouvée dans les bases de données. Les deux échantillons pouvaient être utilisés pour réaliser la recombinaison avec le plasmide pBIN-GW.

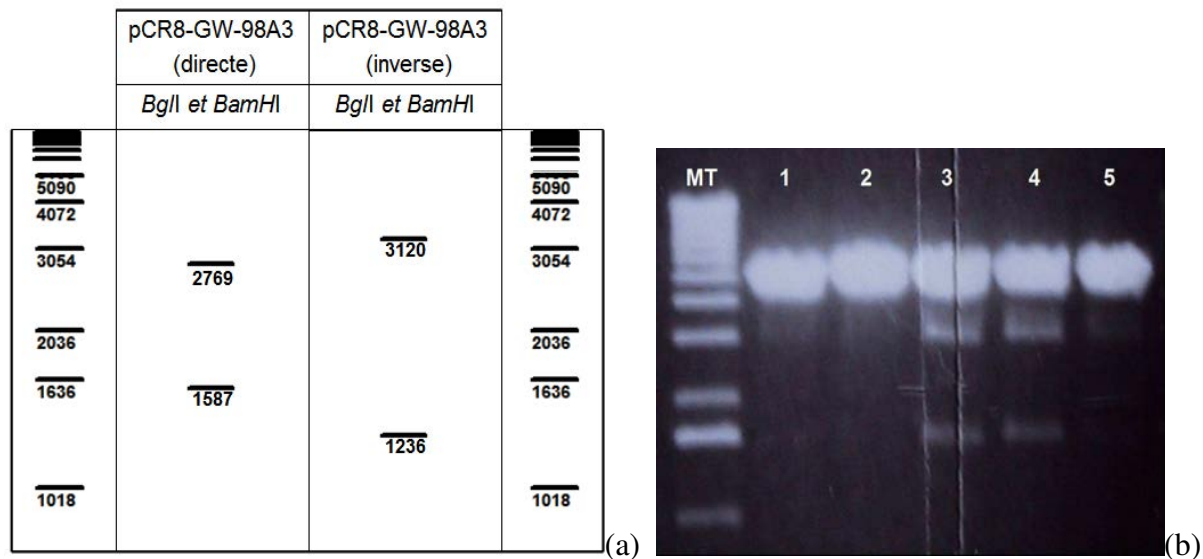


Figure 41 : (a) Profils de digestions théoriques des plasmides pCR8-GW-98A3 que l'on obtient en fonction de l'orientation du gène codant CYP98A3, digérés par les enzymes de restriction *BamHI* et *BglI*, comparés au marqueur de taille (MT) 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). pCR8-GW-98A3 (directe) est le plasmide ayant le gène dans la bonne orientation, et pCR8-GW-98A3 (inverse) est le plasmide ayant le gène dans la mauvaise orientation. (b) Profils de digestions des supposés plasmides pCR8-GW-98A3 digérés partiellement par les enzymes de restrictions *BamHI* et *BglI* (puits 1 à 5) comparés au marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Invitrogen).

Le plasmide pCR8-GW-98A3-3 a été utilisé pour réaliser la recombinaison avec le plasmide pBIN-GW en suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Des cellules TOP10 sont transformées avec le produit de recombinaison avant d'être étalées sur un milieu LB contenant 25 µg/mL de kanamycine. Une dizaine de colonies sont mises en culture afin de réaliser une extraction d'ADN plasmidique avec le kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Annexe 3). Une amplification par PCR a permis de vérifier l'intégrité du plasmide pBIN-GW-98A3 (Figure 45). L'utilisation de l'amorce 35SDIR100 5'-CACTATCCTTCGCAAG ACCCTTCCTCTATATAAGGAA-3' s'hybridant spécifiquement au promoteur 35S du plasmide pBIN et de l'amorce 98A3revECO 5'-GGAATTCTTACATATCGTAAGGCA CGCG-3' s'hybridant spécifiquement sur la séquence codante du CYP98A3 a permis de vérifier que la recombinaison a bien eu lieu et que le gène est orienté dans le bon sens.

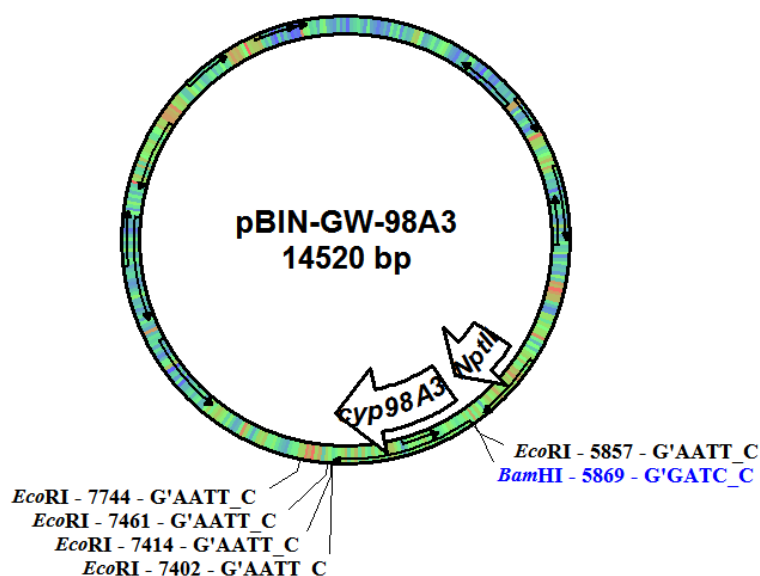


Figure 42 : Plasmide pBIN-GW-98A3

3.2 Obtention des transformants S-98A3

Pour réaliser la transformation de rue avec le plasmide pBIN-GW-98A3 nous avons utilisé la même variante du protocole initial que pour les plantes S-98A22. Le même phénomène caractéristique qu'avec les transformants S-98A22 (bourgeonnement, régénération accrus et renflement des hypocotyles) a été observé au cours de l'étape de sélection. Après repiquage sur milieu sélectif pendant un mois, les tiges feuillées qui ont survécu sont multipliées sur un milieu MS(30) (Figure 46). A ce stade, comme pour les transformants S-98A22, au cours des repiquages, la très forte odeur âcre a été constatée par rapport aux rues sauvages. Au vu des résultats obtenus précédemment avec les transformants S-98A22, ces observations préliminaires nous ont laissé présumer que nos plantes potentiellement transformées contenaient elles aussi une teneur en furocoumarines supérieure à la normale.

Ces plantes repiquées, potentiellement transformées, possèdent en plus du gène codant pour CYP98A22, au moins une copie du gène codant pour CYP98A3 sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV. Elles possèdent donc deux gènes différents codant pour des enzymes ayant une activité similaire. Toutefois, CYP98A22 métabolise seulement le *p*-coumaroyl shikimate (Hehn 2007), alors que CYP98A3 métabolise le *p*-coumaroyl shikimate

mais aussi le *p*-coumaroyl quinate avec une plus faible affinité (Schoch *et al.* 2001). Par ailleurs, l'insertion du transgène *cyp98A3* est concomitante à celle du gène *nptII* qui se trouve également sur l'ADN-T inséré dans le génome de la plante. En effet, l'ADN-T de pBIN-GW-98A3 contient le gène d'intérêt et le gène conférant la résistance à la kanamycine (Cf. matériel et méthodes).



Figure 43 : Rues potentiellement transformées avec la construction 35S::*cyp98A3* en culture *in vitro*.

Nous avons caractérisé 16 plantes afin de mettre en évidence un éventuel « effet transformation » avec la construction 35S::*cyp98A3*.

3.3 Caractérisation moléculaire des transformants

La présence du transgène et du gène marqueur *nptII* au sein de l'ADN génomique des différentes plantes potentiellement transformées par la construction 35S::*cyp98A3* a été vérifiée par PCR sur de l'ADN génomique. La méthode ayant fait ses preuves, nous avons extrait l'ADN génomique des rues transformées en utilisant le kit Plant DNeasy de Qiagen.

Comme pour les transformants K-73A32 et S-98A22, le développement en culture *in vitro* des plantes potentiellement transformées sur milieu sélectif contenant de la kanamycine est un bon indicateur de leur état de transformation. Pour confirmer l'intégration totale de l'ADN-T au sein du génome des plantes (gène *nptII* et gène *cyp98A3*), nous avons mis en évidence leur présence par PCR. Contrairement aux transformants K-73A32 et S-98A22, l'utilisation d'amorces internes permet ici la mise en évidence du seul transgène *cyp98A3* issu de la transformation génétique.

Souche de <i>R. graveolens</i>			Souche de <i>R. graveolens</i>		
	<i>nptII</i>	<i>35S::cyp98A3</i>		<i>nptII</i>	<i>35S::cyp98A3</i>
S.98A3.1	+	+	S.98A3.9	+	+
S.98A3.2	+	+	S.98A3.10	+	+
S.98A3.3	+	+	S.98A3.11	+	+
S.98A3.4	+	+	S.98A3.12	+	+
S.98A3.5	+	+	S.98A3.13	+	+
S.98A3.6	+	+	S.98A3.14	+	+
S.98A3.7	+	+	S.98A3.15	+	+
S.98A3.8	+	+	S.98A3.16	+	+

Tableau 10: Résultats de l'amplification des gènes *nptII* et *35S::cyp98A3* sur de l'ADN génomique extrait de feuilles de rue. (+) signifie que l'amplification a bien eu lieu et que l'amplicon est de taille attendu. (-) signifie qu'il n'y a pas eu d'amplification.

La mise en évidence du gène de sélection *nptII* est réalisée avec les mêmes amorces que citées précédemment. Celle du transgène *35S::cyp98A3* a été réalisée par PCR en utilisant les amorces 98A3dirBAM 5'-GGGATCCATGTCGTGGTTTCTAATAGCG-3' et 98A3rev ECO 5'-GGAATTCTTACATATCGTAAGGCACGCG-3' s'hybridant spécifiquement à 56°C. Après amplification, l'analyse de chaque échantillon est réalisée sur un gel d'agarose à 1%. Les tailles attendues sont respectivement de 1500 et 790 pb pour le gène *cyp98A3* et le gène *nptII*. Chaque plante a été analysée plusieurs fois. La reproductibilité et la spécificité des amplifications ont été réalisées en présence de deux témoins négatifs (ADN génomique de rue

sauvage et eau) et un témoin positif (plasmide pBIN-GW-98A3). Les résultats d'amplification pour chaque plante supposée transformée sont donnés dans le tableau 10.

Les résultats montrent que les 16 plantes testées sont transformées génétiquement : l'ADN-T a bien été inséré en entier. L'absence de contamination bactérienne chez les plantes *in vitro* a été vérifiée comme expliqué au paragraphe 1.3 du chapitre III.

3.4 Dosage des phénylpropanoïdes

Pour comparer les résultats avec ceux décrits pour la série de plantes transgéniques S-98A22 nous avons effectué des analyses métaboliques similaires. Un dosage des 3 furocoumarines majeures (le psoralène, le 8-MOP et le 5-MOP) a été réalisé sur l'ensemble des transformants S-98A3. Par ailleurs, une analyse qualitative de la rutine, du ferulate, de l'umbelliférone et de la scopolétine est venue compléter ces résultats.

Deux prélèvements de matériel végétal ont été réalisés simultanément afin de pouvoir corréler le niveau d'expression des gènes *cyp73A32* et *cyp98A22*, aux teneurs en phénylpropanoïdes. Un premier pour l'extraction de composés phénylpropanoïdes et un second pour l'extraction des ARNs totaux.

Les résultats décrits sur la figure 44 correspondent à un dosage de la teneur en furocoumarines chez 6 plantes non transformées (WT) et chez 16 transformants (S-98A3). Afin de vérifier si les mesures observées sont significativement différentes, nous avons réalisé une analyse statistique. Les résultats sont représentés sur la figure 45.

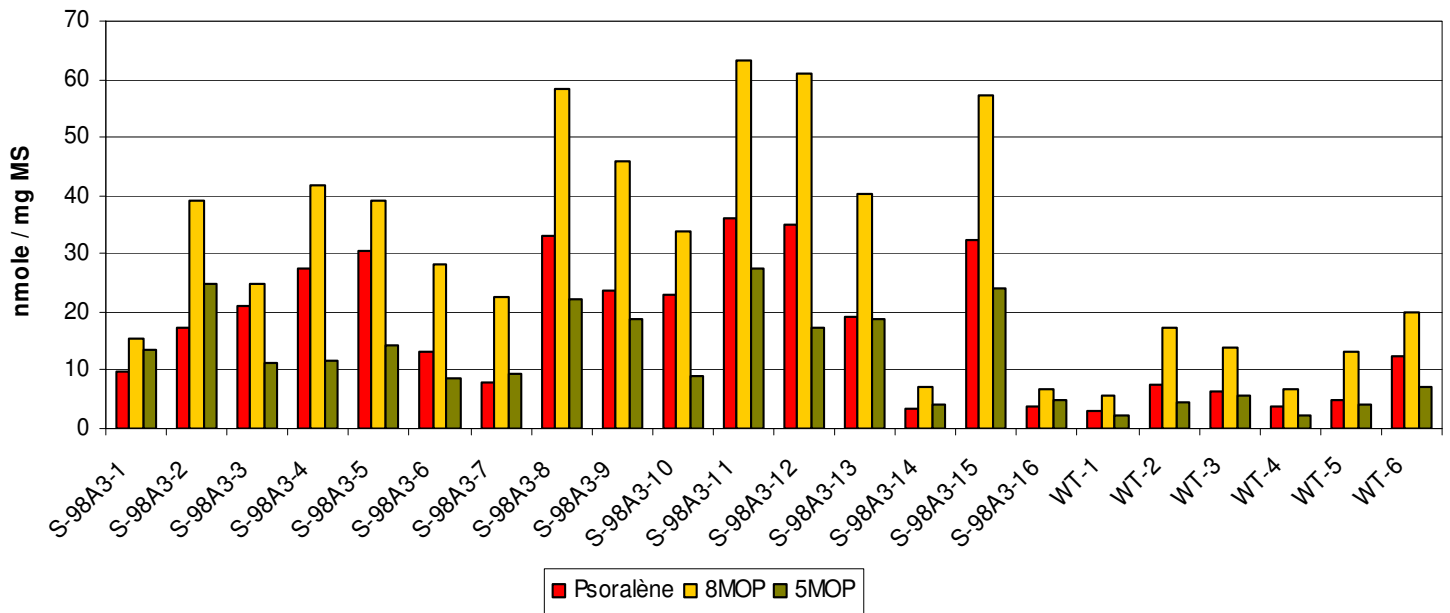


Figure 44: Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rues témoins (WT) et de rues transformées (S-98A3) avec le gène codant pour la C3'H d'A. *thaliana* exprimées en nmole par mg de matière sèche.

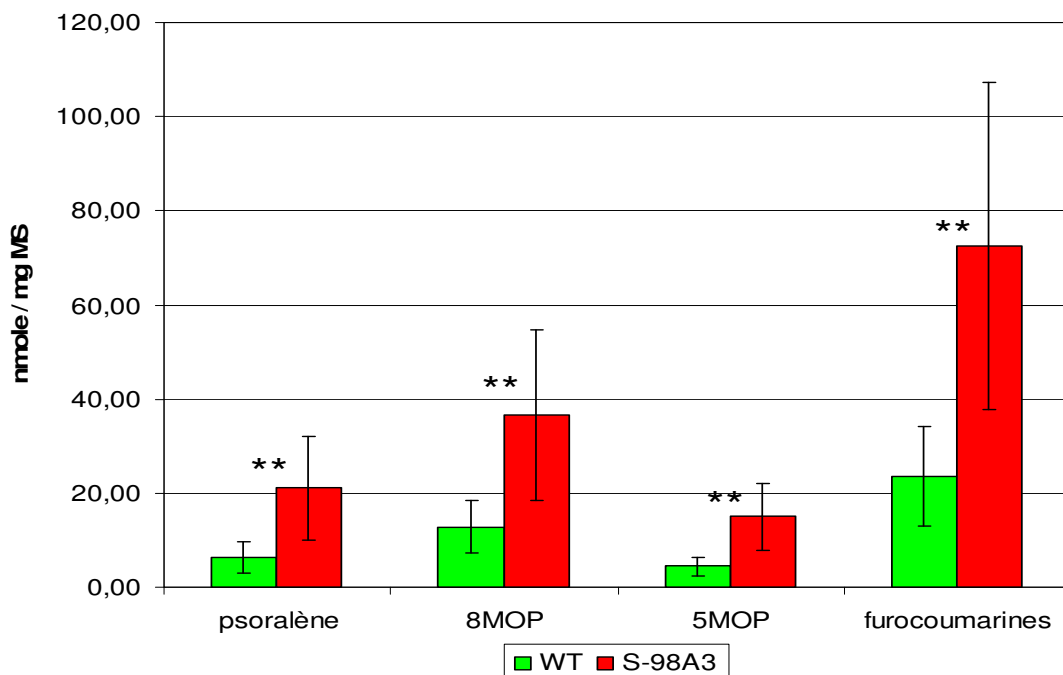


Figure 45 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines (valeurs cumulées des trois précédents) dosées dans un échantillon de rues témoins (WT) ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec le gène codant pour la C3'H d'A. *thaliana* (S-98A3). ** : différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les deux échantillons.

Sur l'ensemble des transformants on observe une très forte augmentation de la concentration en furocoumarines (3X). Les teneurs en psoralène, en 8-MOP, et en 5-MOP augmentent dans les mêmes proportions chez l'ensemble des transformants. Comme pour la série de plantes transgéniques S-98A22, il semblerait que la transformation génétique de rue avec la construction 35S::*cyp98A3* a donc une incidence très significative sur la production de furocoumarines.

Cette étude spécifique du psoralène, du 5-MOP et du 8-MOP a été complétée par une analyse qualitative d'autres composés phénylpropanoïdes présents dans la plante. Une analyse statistique a été effectuée à partir des aires sous les pics correspondant à la rutine, au ferulate, à l'umbelliférone et à la scopolétine pour 6 plantes non transformées (WT) et pour les 16 transformants (S-98A3). Comme cela avait été effectué pour la série S-98A22, dans la mesure où il ne s'agit que d'une étude qualitative, les valeurs des aires sous les pics ont été ramenées à une même échelle arbitraire. Ainsi, l'ensemble des composés analysés peut être représenté sur le même diagramme. Il n'est donc pas possible de comparer les valeurs de deux substances différentes. L'ensemble des résultats est montré sur la figure 46.

Le résultat du test réalisé sur l'umbelliférone indique une augmentation d'un facteur 3 chez les transformants S-98A3. La transformation génétique de rue avec la construction 35S::*cyp98A3* a donc une incidence très significative sur la teneur en umbelliférone. Ce résultat est surprenant en comparaison avec celui obtenu pour les transformants S-98A22 pour lesquels on observe une diminution d'un facteur 3,5.

On constate également une différence notable pour la scopolétine. Les transformants S-98A3 ont une teneur en scopolétine augmentée d'un facteur 2. C'est une différence majeure avec les transformants S-98A22 mais qui concorde avec les travaux de Kai (Kai *et al.* 2006). En effet, cet auteur a montré que des plants d'*A. thaliana* surexprimant CYP98A3 ont une teneur en scopolétine plus élevée que des arabettes sauvages.

Enfin, le niveau de production des autres molécules (rutine et ferulate) ne semble pas être affecté par l'insertion du gène *cyp98A3* chez *Ruta graveolens*.

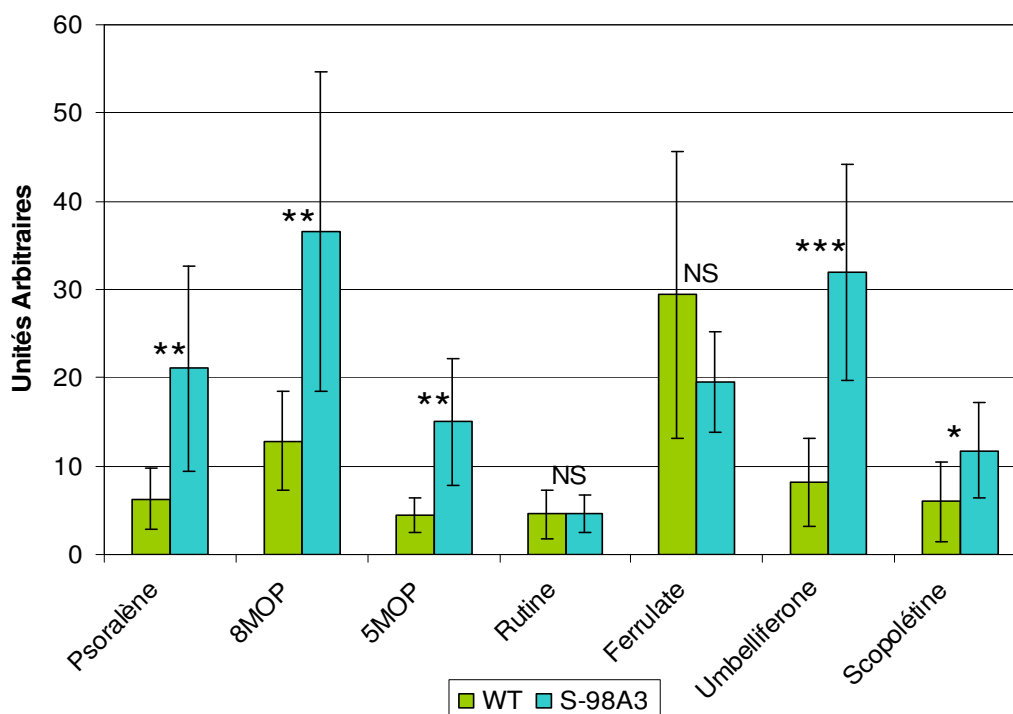


Figure 46 : Valeurs moyennes exprimées en unités arbitraires par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine dosés dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec le gène codant pour la C3'H d'*A. thaliana*. NS : pas de différence significative entre les deux échantillons ($p=0,05$). * : différence significative ($p<0,05$). ** : différence hautement significative ($p<0,01$). *** : différence très hautement significative ($p<0,001$).

3.5 Quantification du nombre de transcrits C4H et C3'Hs

Les analyses métaboliques des transformants S-98A3 présentés précédemment sont sensiblement identiques à ceux obtenus avec les transformants S-98A22, à l'exception de l'umbelliférone et de la scopolétine pour laquelle on a une très forte augmentation. Afin d'affiner ces résultats, nous souhaitons corrélérer les variations des composés phénylpropanoïdes observées avec le niveau d'expression des gènes codant pour CYP73A32, CYP98A22 et CYP98A3. Cela permettrait ainsi de voir si la surexpression d'un orthologue de

la C3'H de rue (CYP98A3) a un effet sur le niveau d'expression du gène *cyp98A22*. Ces expérimentations permettront également de vérifier que le transgène est exprimé correctement.

3.5.1 Choix des amorces

Les amorces utilisées pour amplifier respectivement une séquence de l'ARN ribosomal, du gène *cyp73A32* et du gène *cyp98A22* sont les mêmes que celles utilisées précédemment pour caractériser les transformants S-98A22. Ces couples d'amorces sont respectivement : 16Sdir ; 16Srev, RtC4Hfor1 ; RtC4Hrev1 et RT98A22-DIR1 ; RT98A22-REV1 (tableau 11).

Amorce	séquence
26Sdir	5'-GGGCGAAGCCAGAGGAAAC-3'
26Srev	5'-ACGAACGATTTGCACGTCAGT-3'
RtC4Hfor1	5'-TCAAATCACCGAGCCTGACA-3'
RtC4Hrev1	5'-CATCCTGAGGCGGAGAGTCT-3'
RT98A3-DIR1	5'-TCATTGCTCGTACCGATTTCA-3'
RT98A3-REV1	5'-AGCTAACGGTAAGCGCATGT-3'
RT98A22-DIR1	5'-GAGGTTGCACCCACCAACTC-3'
RT98A22-REV1	5'-CACCTATCTTGACGTTGGCGT-3'

Tableau 11 : amorces utilisées en PCR quantitative.

3.5.2 Comportement des gènes C4H et C3'H au niveau transcriptionnel

Afin d'être sûrs de nos résultats, nous avons réalisé chaque amplification en duplica. Comme précédemment, dès que la différence des Ct d'un duplica s'écarte de plus de 3% de la moyenne, l'échantillon est considéré comme non exploitable, et est rejeté. Il a été décidé de caractériser 5 transformants S-98A3 dont la teneur en furocoumarine était importante, et 5 rues témoins. Ces 5 transformants sont les individus S-98A3-2, 4, 8, 12 et 15. Sur la figure 50 est représenté le niveau relatif d'ARNm C4H et C3'H (*cyp98A22*) de chaque individu analysé. Pour chaque transcrit, un test T de student a été réalisé sur les deux séries testées (plantes transformées et témoins).

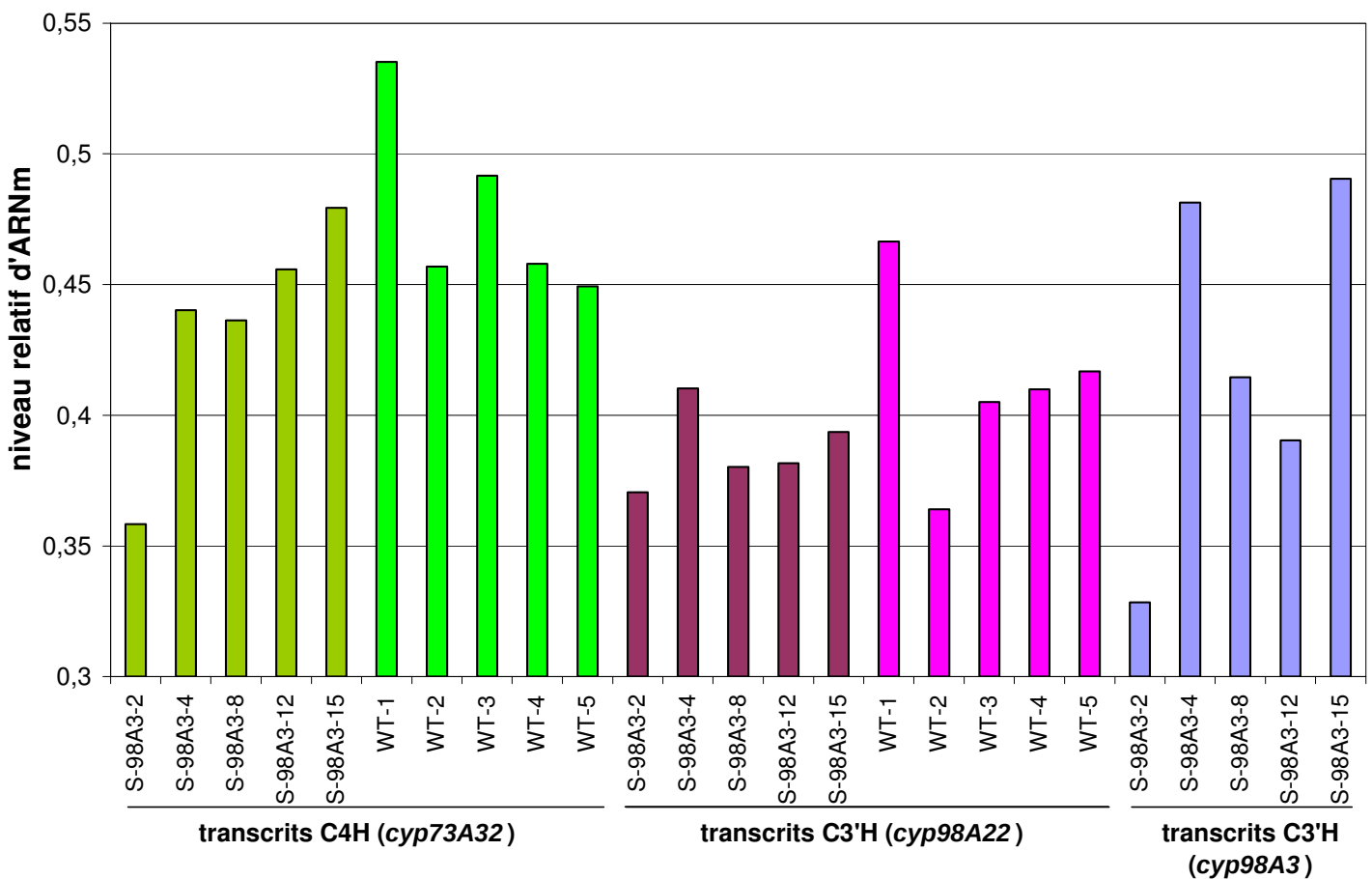


Figure 47 : Niveaux relatifs des transcrits C4H et C3'H (*cyp98A22*) obtenus par analyse en RT-PCR en temps réel pour un échantillon de rues témoins (WT) et de plantes transgéniques (S-98A3).

L'ensemble de nos résultats a montré qu'il n'y avait aucune différence significative ($p=0,05$) entre les rues témoins et les plantes transgéniques pour les transcrits *cyp73A32* et *cyp98A22*. Néanmoins, l'expression du transgène *cyp98A3* est constatée chez l'ensemble des plantes S-98A3, malgré un niveau relatif d'ARNm C3'H un peu plus faible pour l'individu S-98A3-2. Cette plante a comme caractéristique un niveau relatif d'ARNm relativement bas pour l'ensemble des transcrits analysés (*cyp73A32*, *cyp98A22* et *cyp98A3*).

Les effets observés sur l'augmentation de la teneur en psoralène, en 5-MOP, en 8-MOP, en umbelliférone et en scopolétine seraient donc imputables à la seule expression du CYP98A3.

4 Transformants S-98A22INV

Après avoir étudié les transformants S-98A22 et S-98A3 une quatrième famille de transformants a été construite. Les plantes transgéniques S-98A22INV ont été produites pour répondre à la question suivante : quelles variations métaboliques peuvent être rencontrées chez des rues sous exprimant leur C3'H ? Après avoir étudié les diverses techniques permettant une sous expression totale ou partielle de CYP98A22, nous avons décidé d'utiliser l'approche antisens. Cette technique consiste à transformer génétiquement *R. graveolens* avec la séquence non codante de sa C3'H. Pour cela, cette séquence non codante a été clonée en orientation inverse dans le plasmide pBIN-GW, sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV.

4.1 Construction de pBIN-GW-98A22INV

Lors de la construction du plasmide pBIN-GW-98A22 (Cf paragraphe 2.2 chapitre III) nous avons obtenus quatre plasmides pCR8-GW-98A22. Sur les quatre constructions, deux avaient inséré le gène *cyp98A22* dans le sens inverse. Ces plasmides 3 et 4 que l'on avait

conservé jusque là n'ont pas été envoyés à séquencer. En effet, cette construction permet la transcription d'un ARN antisens *cyp98A22* dans les cellules transformées. Ce transcrit n'étant pas traduit, il n'est donc pas nécessaire de vérifier si la séquence contient ou non une mutation. L'objectif affiché est la sous expression de CYP98A22 *via* la production d'un ARN double brin qui sera dégradé.

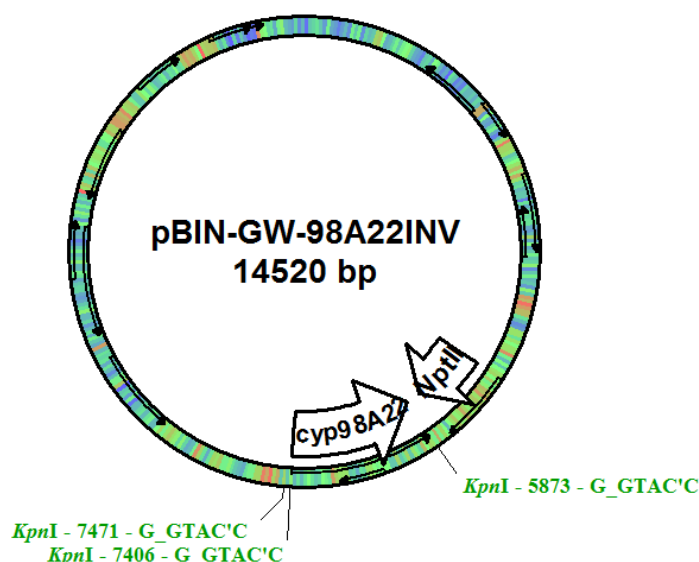


Figure 48 : Plasmide pBIN-GW-98A22INV

Le plasmide pCR8-GW-98A22-3 (Cf paragraphe 2.2 chapitre III) a été utilisé pour réaliser la recombinaison avec le plasmide pBIN-GW en suivant les recommandations du fournisseur. Une amplification par PCR a permis de montrer l'intégrité du plasmide pBIN-GW-98A22INV (Figure 51) et l'utilisation de l'amorce 35SDIR100 et de l'amorce 98rue KpnIDIR2 5'-GGGGTACCATGGGTCTCCCACTCATCCC-3' s'hybridant spécifiquement sur la séquence codante du CYP98A22 permet de vérifier que la recombinaison s'est bien faite et que l'orientation du gène est dans le sens inverse.

4.2 Obtention des transformants S-98A22INV

Une centaine d'hypocotyles de rue a été transformée génétiquement selon le protocole de transformation décrit dans le chapitre matériel et méthodes. Les tiges feuillées âgées de un

mois et ayant survécu à la phase de sélection sur antibiotique ont été multipliées (Figure 52) et caractérisées d'un point de vue moléculaire. A ce stade de développement, contrairement aux transformants S-98A22 et S-98A3 aucun phénotype visible n'a été observé : il n'y a pas de bougeonnement accru ni d'odeur âcre qui se dégage.



Figure 49 : Rues potentiellement transformées avec la construction 35S::98A22INV cultivées en *in vitro*.

Ces plantes repiquées, potentiellement transformées, possèdent en plus du gène naturel codant pour CYP98A22, au moins une copie de la séquence antisens du gène *cyp98A22*. Cette séquence est sous le contrôle du promoteur constitutif 35S du CaMV. En théorie, l'hybridation spécifique de l'ARN antisens au transcrit *cyp98A22* (ARN sens) devrait conduire *in vivo* à l'extinction au moins partielle de la C3'H. L'observation chez ces transformants d'une modification de la concentration en certains métabolites, indiquerait l'existence d'une sous expression, même partielle (Franke *et al.* 2002b ; Abdulrazzak *et al.* 2006).

La caractérisation moléculaire a été réalisée sur 14 plantes indépendantes.

4.3 Caractérisation moléculaire des transformants S-98A22INV

L'extraction de l'ADN génomique des 14 individus s'est faite en suivant les recommandations décrites dans la partie matériel et méthodes. La présence du transgène et du gène marqueur *nptII* au sein de l'ADN génomique des différentes plantes potentiellement transgéniques a été vérifiée par PCR. Comme pour les transformants K-73A32 et S-98A22, l'utilisation d'amorces internes n'a pas permis la mise en évidence de la séquence inversée du gène *cyp98A22* intégrée lors de la transformation génétique. En effet, réaliser une PCR avec de telles amorces conduirait à amplifier le gène *cyp98A22* de manière systématique. Afin de révéler uniquement l'intégration du transgène *35S::cyp98A22INV*, nous avons utilisé une amorce sens s'hybridant au promoteur et une amorce reverse s'hybridant à la séquence inversée du gène *cyp98A22*.

Souche de <i>R. graveolens</i>			Souche de <i>R. graveolens</i>		
	<i>nptII</i>	<i>35S::cyp98A22INV</i>		<i>nptII</i>	<i>35S::cyp98A22INV</i>
S-98A22INV-1	-	-	S-98A22INV-8	+	+
S-98A22INV-2	+	+	S-98A22INV-9	+	+
S-98A22INV-3	+	+	S-98A22INV-10	+	+
S-98A22INV-4	+	+	S-98A22INV-11	+	+
S-98A22INV-5	+	+	S-98A22INV-12	+	+
S-98A22INV-6	+	+	S-98A22INV-13	+	+
S-98A22INV-7	+	+	S-98A22INV-14	+	+

Tableau 12 : Résultats de l'amplification des gènes *nptII* et *35S::cyp98A22INV* sur de l'ADN génomique extrait de feuilles de rue. (+) signifie que l'amplification a bien eu lieu et que l'amplicon est de taille attendu. (-) signifie qu'il n'y a pas eu d'amplification.

Comme dans les précédentes caractérisations moléculaires, les amorces NptDIR et NptREV ont été utilisées pour amplifier (donc mettre en évidence) le gène de sélection *nptII*. Les amorces 35SDIR100 et 98A22DIR-INV 5'-GTATGACCTAAGTGAAGACA-3' s'hybridant spécifiquement à 56°C ont été utilisées pour montrer la présence de la

construction 35S::cyp98A22INV. Après amplification, chaque échantillon a été analysé sur un gel d'agarose à 1%. Les tailles attendues sont respectivement de 800 et 790 pb pour le gène codant pour la séquence inversée et le gène *nptII*. Afin de vérifier la spécificité de l'amplification, Chaque plante a été analysée plusieurs fois, et toutes les expérimentations ont été réalisées avec deux témoins négatifs (ADN génomique de rue sauvage et eau) et un témoin positif (plasmide pBIN-GW-98A22INV). Les résultats d'amplification pour chaque plante supposée transformée sont donnés dans le tableau 12.

Les résultats obtenus montrent que 13 individus sur les 14 sont effectivement transformés avec la totalité de l'ADNT-T. Une analyse fine de la teneur en certains phénylpropanoïdes a été réalisée sur les 13 transformants S-98A22INV.

4.4 Dosage des phénylpropanoïdes

Dans un souci d'homogénéité avec les séries de plantes transgéniques précédemment décrites, les 3 furocoumarines majeures ainsi que la rutine, la scopolétine, le ferulate et l'umbelliférone ont été analysés chez l'ensemble des transformants S-98A22INV. Deux prélèvements simultanés de matériel végétal ont été réalisés afin de corrélérer une éventuelle variation des teneurs des composés analysés au niveau d'expression du CYP73A32 et du CYP98A22. Le premier a permis l'analyse des diverses molécules par HPLC, et le second a été utilisé pour extraire les ARNs totaux.

Les teneurs en furocoumarines dosées chez 6 plantes non transformées (WT) et chez 13 transformants (S-98A22INV) sont représentées graphiquement sur la figure 50. Une analyse statistique résumée sur la figure 51 a été effectuée à partir des données expérimentales.

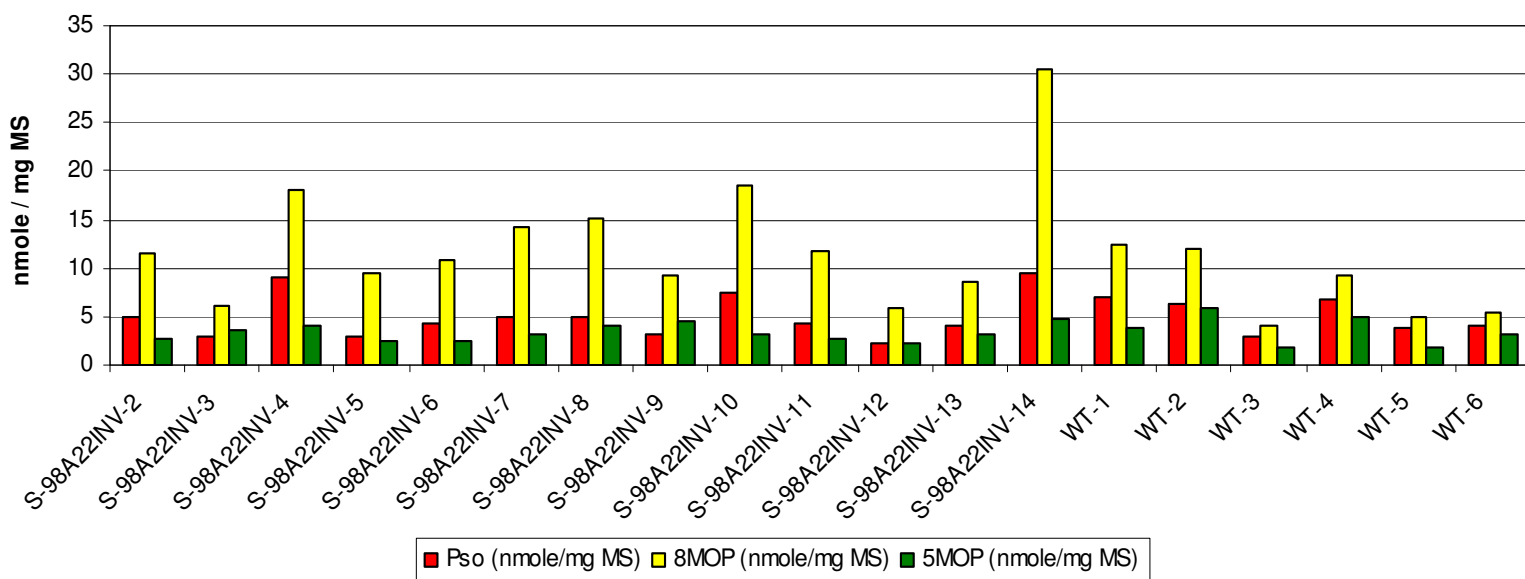


Figure 50 : Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rues témoins et de rues transformées avec la séquence codante inversée du gène codant pour la C3'H de *R. graveolens* exprimées en nmole par mg de matière sèche.

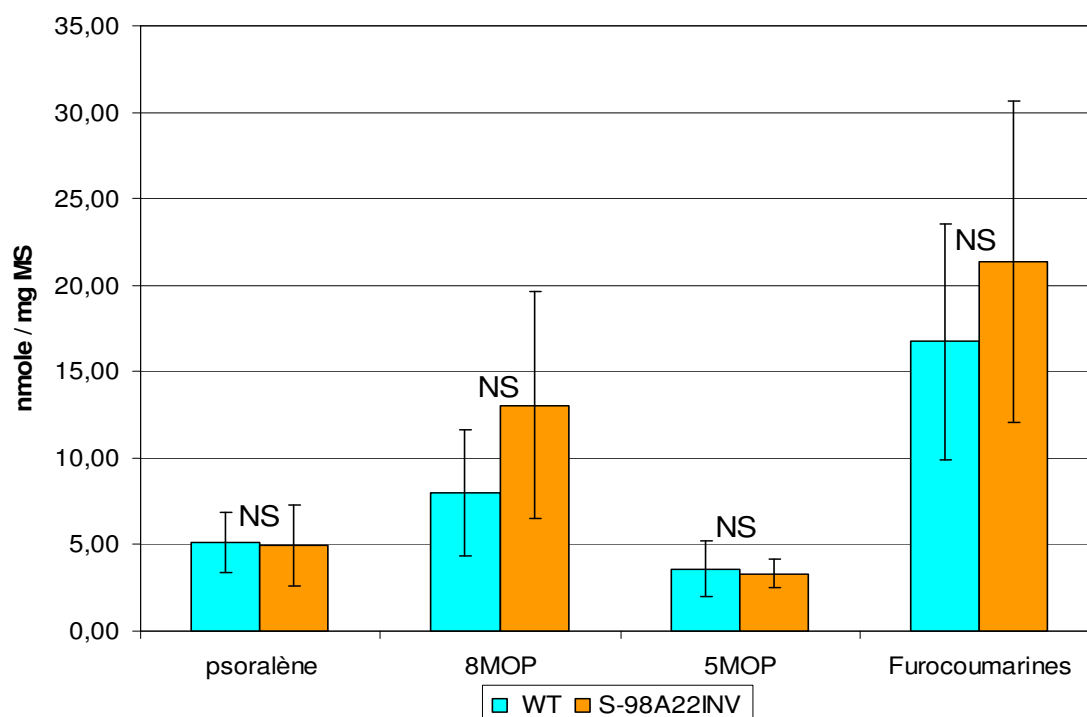


Figure 51 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines (valeurs cumulées des trois précédents) dosées dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec la séquence codante inversée du gène codant pour la C3'H de *R. graveolens*. NS : différence non significative ($p=0,05$) entre les échantillons.

Cette analyse a montré qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives concernant les teneurs en psoralène, en 8-MOP, en 5-MOP entre la population de plantes sauvages et l'ensemble des transformants. Visiblement, l'insertion du gène *cyp98A22* en sens inversé n'a pas eu d'impact sur la production de furocoumarines. Ces résultats sont confortés par l'analyse qualitative de la teneur en rutine, en ferulate, en umbelliférone et en scopolétine effectuée sur les mêmes plantes caractérisées précédemment : les 6 plantes témoins (WT) et les 13 transformants (S-98A22INV). L'ensemble des données (moyennes, écarts types et résultats du test T) sont représentés graphiquement sur la figure 52.

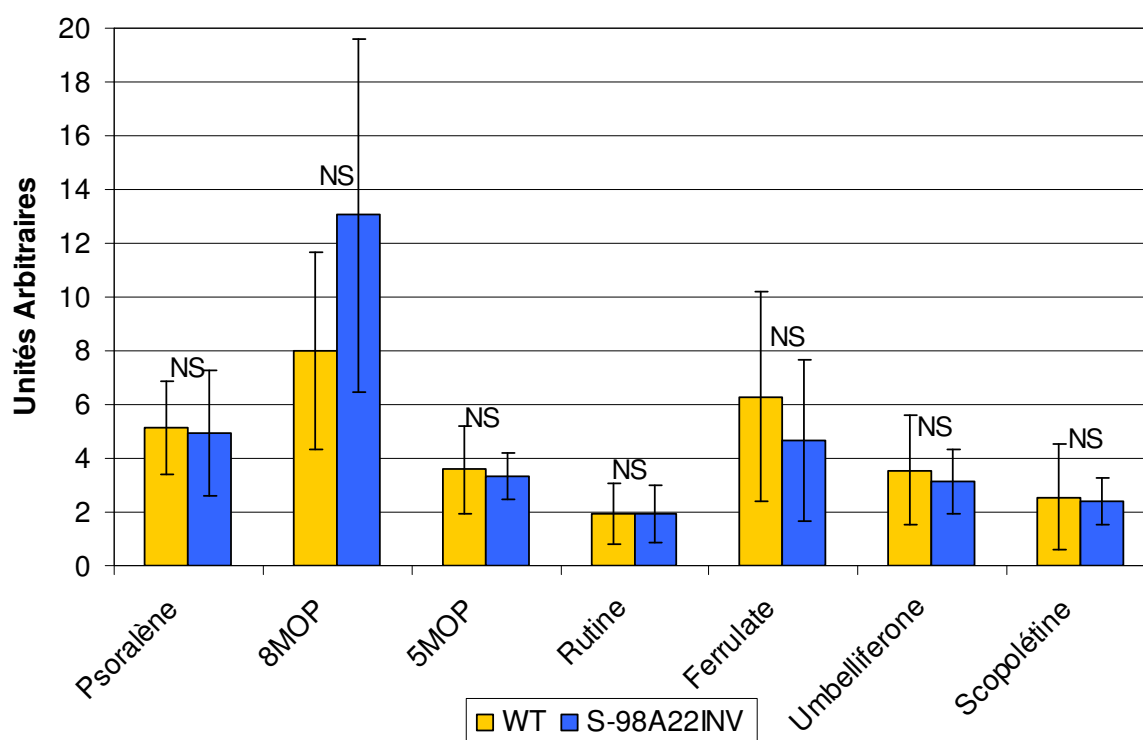


Figure 52 : Valeurs moyennes exprimées en unités arbitraires par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine dosés dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec la séquence antisens du gène codant pour la C3'H de *R. graveolens*. NS : différence non significative ($p < 0,05$) entre les échantillons.

4.5 Dosage des lignines des transformants S-98A22INV

S'il n'y a pas d'effet sur la synthèse en furocoumarines, en rutine, en ferulate, en scopolétine et en umbelliférone, nous avons tout de même cherché à savoir s'il y avait une incidence sur la qualité de la lignine. Ainsi, une analyse fine de la composition en lignine des transformants S-98A22INV a été décidée afin de vérifier si nos plantes ont subi une augmentation de la teneur en unités H comme cela a été observé chez les mutants *ref8* d'*A.thaliana* (Franke *et al.* 2002a). Les dosages ont été réalisés par l'équipe du professeur Lapierre (INRA Paris-Grignon). Comme pour les expérimentations effectuées chez les transformants S-98A22, nous avons prélevé des tiges sur des rues *in vitro* âgée de 4 semaines, auxquelles on a enlevé les racines et toutes les feuilles. Au cours du précédent dosage (transformants S-98A22), on avait observé que les répétitions biologiques (4 témoins et 3 transgéniques) présentaient une variabilité assez marquée en terme de rendement. Nous nous sommes donc efforcés de prélever des tiges de plantes homogènes. Ne pouvant difficilement faire plus de 10 thioacidolyses à la fois, 5 rues transformées et 5 témoins (pris au hasard) ont été thioacidolysées (S-98A22INV-4, 5, 6, 7 et 8). Les rendements en monomères (Ar-CHSEt-CHSEt-CH₂SEt) issus des unités H, G et S liées seulement en β -O-4, sont indiqués dans le tableau 13.

Echantillon	Rendement en μ mole / g MS				%H	%G	%S
	H	G	S	total			
Moyenne WT	0.84	53.7	86.9	141.4	0.57	37.5	61.9
Ecart type	0.46	16.7	15.8	29.0	0.23	5.4	5.6
Moy S-98A22INV	2.75	57.6	80.7	141.0	1.98	40.8	57.2
Ecart type	1.54	12.6	16.0	27.7	1.02	2.7	2.7
Test T bilatéral	0,029	0,682	0,548	0,991	0,016	0,255	0,130

Tableau 13 : Résultats de thioacidolyse de tiges de rues sauvages (WT) et de rues transformées avec la construction 35S::*98A22INV* (S-98A22INV)

Ces résultats confirment que, comme pour la série S-98A22, une certaine variabilité est observée entre les plantes témoins. Malgré cette variabilité, on retrouve des rendements identiques à la première analyse (paragraphe 2.6 chapitre III). Les lignines de tiges de rue témoins sont essentiellement constituées d'unités S (plus de 60%) et G (environ 35%) accompagnées de quantités très mineures d'unités H (environ 0.5%). On retrouve également un rapport S/G proche de 2. Le rendement en produits monomères, proche de 150 $\mu\text{moles} / \text{g}$ est identique à la série précédente et suggère qu'il y a 5 à 10% de lignines dans ces tiges (1 gramme de lignines de dicotylédone génère 1500 à 2500 μmoles de produits). Cette variabilité provient du fait qu'on ne travaille pas sur des clones mais des individus issus de graines différentes.

De plus, la variabilité interplante observée entre plantes témoins est valable également pour la série de plantes transformées, en particulier pour le S-98A22INV-6. Ces plantes transgéniques proviennent elles aussi de graines différentes. Malgré la variabilité observée, le résultat le plus marquant est l'enrichissement en unités H (environ 2%). En effet, le pourcentage d'unités H est significativement supérieur dans ces 5 plantes transformées (à $p < 0,05$) que dans les 5 témoins correspondants.

Les autres paramètres (rendement, rapport S/G) ne permettent pas de distinguer les plantes transformées des plantes témoins. Les rendements totaux similaires démontrent que le taux de lignines n'est pas affecté. La branche qui conduit aux unités H semble simplement un peu plus empruntée en raison de la transformation.

Contrairement aux transformants S-98A22 et bien que n'ayant pas observé de différence au niveau de la synthèse de furocoumarines, il y a un effet net de la transformation sur la teneur en unités H de la composition en lignine, malgré une fréquence des unités H variable d'une plante transformée à l'autre. Ces résultats vont dans le sens des travaux réalisés par Franke et ses collaborateurs (Franke *et al.* 2002a), travaux qui ont porté sur le mutant *ref8* d'*Arabidopsis thaliana*. La lignine de ce mutant défectueux dans le gène codant pour la C3'H est formée essentiellement d'unité H.

4.6 Quantification du nombre de transcrit C4H et C3'H

Afin d'aller plus loin dans notre analyse, nous avons cherché à savoir s'il y avait une corrélation entre l'augmentation de la teneur en unité H, et le niveau d'expression des gènes codant pour CYP73A32 et CYP98A22. Rappelons que l'obtention de cette série de rues transgéniques avait pour objectif de sous exprimer la C3'H chez ces plantes.

4.6.1 Choix des amorces

Les amorces utilisées pour amplifier respectivement une séquence de l'ARN ribosomal, du gène *cyp73A32* et du gène *cyp98A22* sont les mêmes que celles utilisées précédemment pour caractériser les transformants S-98A22 et S-98A3. (Cf tableau 11)

4.6.2 Comportement des gènes C4H et C3'H au niveau transcriptionnel

Pour assurer la fiabilité de nos résultats, nous avons pris les mêmes précautions que pour les expérimentations précédentes : réalisation de dupliqua ; rejet si variabilité des Ct (3%). Les niveaux relatifs des transcrits *cyp73A32* et *cyp98A22* correspondant aux deux séries testées sont représentés graphiquement sur la figure 53.

Contrairement aux résultats obtenus avec les familles de transformants précédentes, une différence entre les transformants S-98A22INV et les rues témoins a été observée. Il semblerait qu'il y ait une différence hautement significative ($p < 0,01$) entre l'ensemble des plantes transgéniques et les plantes témoins pour le niveau relatif de transcrits C4H. Ainsi, ces transformants présentaient un nombre de transcrits inférieur à celui rencontré chez les rues sauvages. La transformation génétique de *R. graveolens* avec la construction *35S::98A22INV* impliquaient donc une diminution du niveau transcriptionnel du gène *cyp73A32* codant pour

la C4H. Par ailleurs, contrairement à ce que l'on attendait, il n'y aurait aucune différence significative entre les deux populations testées pour le niveau relatif en transcrit C3'H.

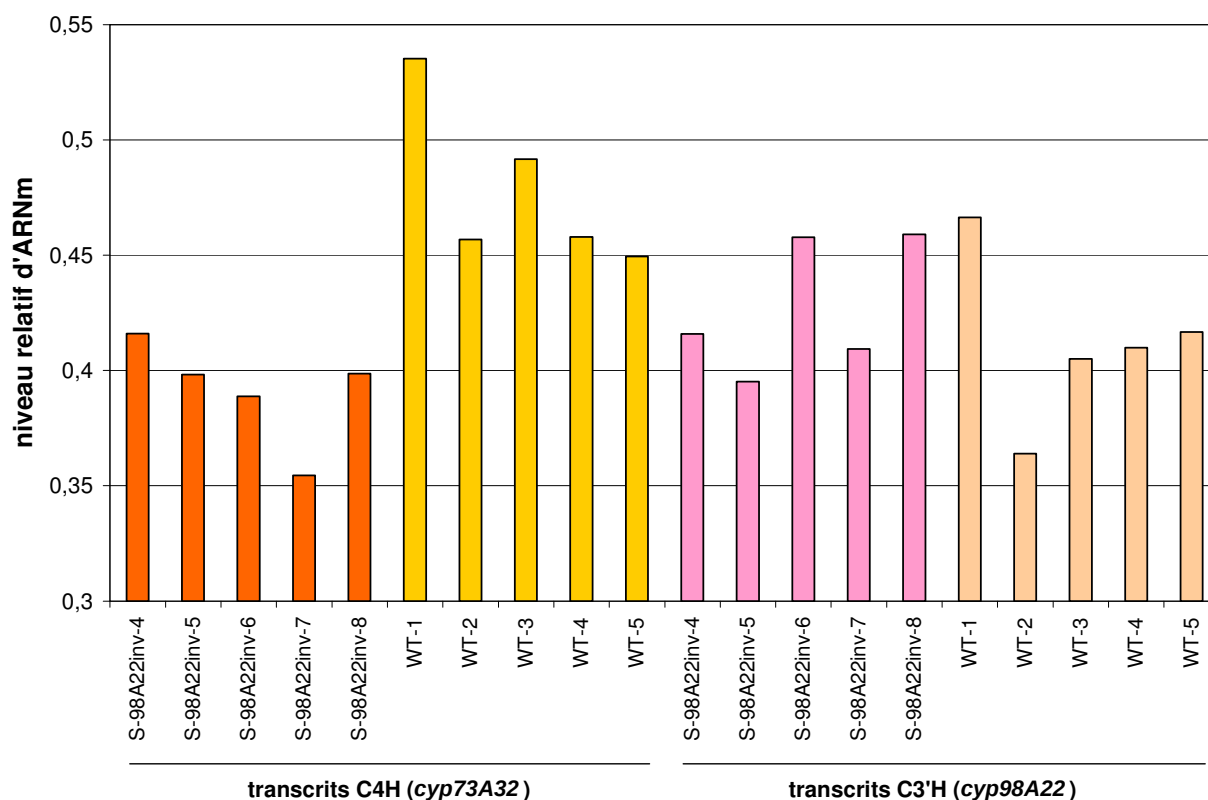


Figure 53 : Niveaux relatifs des transcrits C4H et C3'H (*cyp98A22*) obtenus par analyse en RT-PCR en temps réel pour un échantillon de rues témoins (WT) et de plantes transgéniques (S-98A22INV).

5 Transformants S-71AJ1

Les plantes transgéniques S-98A22 et S-98A3 ont montré qu'il est possible d'augmenter la teneur en furocoumarines grâce à des approches d'ingénierie métabolique. Ces résultats intéressants ont été obtenus avec des travaux portant sur des enzymes n'appartenant pas à la voie de biosynthèse des furocoumarines. Ces modifications métaboliques concernent non seulement les furocoumarines mais aussi d'autres phénylpropanoïdes. Nous pouvons donc maintenant nous demander si la modulation de la production des seules furocoumarines pourrait être réalisée par la surexpression d'un gène spécifique de cette voie.

Suite à la caractérisation de la psoralène synthase d'*Ammi majus* par notre équipe (Larbat *et al.* 2007), une cinquième famille de transformants a été produite dont l'objectif affiché était la surproduction spécifique de furocoumarines. A cet effet, le plasmide pBIN-GW-71AJ1, dont le gène codant la psoralène synthase mis sous le contrôle constitutif du promoteur 35S du CaMV, a été construit.

5.1 Construction de pBIN-GW-71AJ1

L'ADNc du gène codant le CYP71AJ1 a été amplifié à partir d'un plasmide pGEM avec les amorces Am71ADIR 5'-CGGTACCATGAAGATGCTGGAACAGAAT-3' et Am71AREV 5'-CGAATTAAAGCAACTGCAAGTGAAA-3'. Le produit de PCR a été cloné dans le plasmide pCR8®/GW/TOPO®, étape essentielle pour le transfert dans le plasmide pBIN-GW. Dix plasmides pCR8-GW-71AJ1 amplifiés ont été digérés par *PvuII* pour s'assurer de l'intégration et de l'orientation du gène *cyp71AJ1*. Les profils de digestions obtenus par l'enzyme de restriction *PvuII* sont comparés aux profils théoriques attendus (Figure 54).

Cette comparaison nous révèle que les échantillons 1, 4, 5 et 7 ont le gène codant le CYP71AJ1 dans le bon sens. Ces quatre échantillons ont été séquencés. Seul le plasmide pCR8-GW-71AJ1-4 a pu être utilisé pour réaliser la recombinaison avec le plasmide pBIN-GW car il ne présentait pas de mutation liée à l'amplification par PCR.

La recombinaison entre le plasmide pCR8-GW-71AJ1 et le plasmide pBIN-GW a été réalisée en suivant les recommandations du fournisseur. Une amplification par PCR a permis de vérifier l'intégrité du plasmide pBIN-GW-71AJ1. L'utilisation de l'amorce 35SDIR100 et de l'amorce Am71SEQ 5'-GAATATTGGA GACAAGTAAA-3' s'hybridant spécifiquement sur la séquence codante du CYP71AJ1 a permis de vérifier que la recombinaison s'est bien faite et que le gène est orienté dans le bon sens.

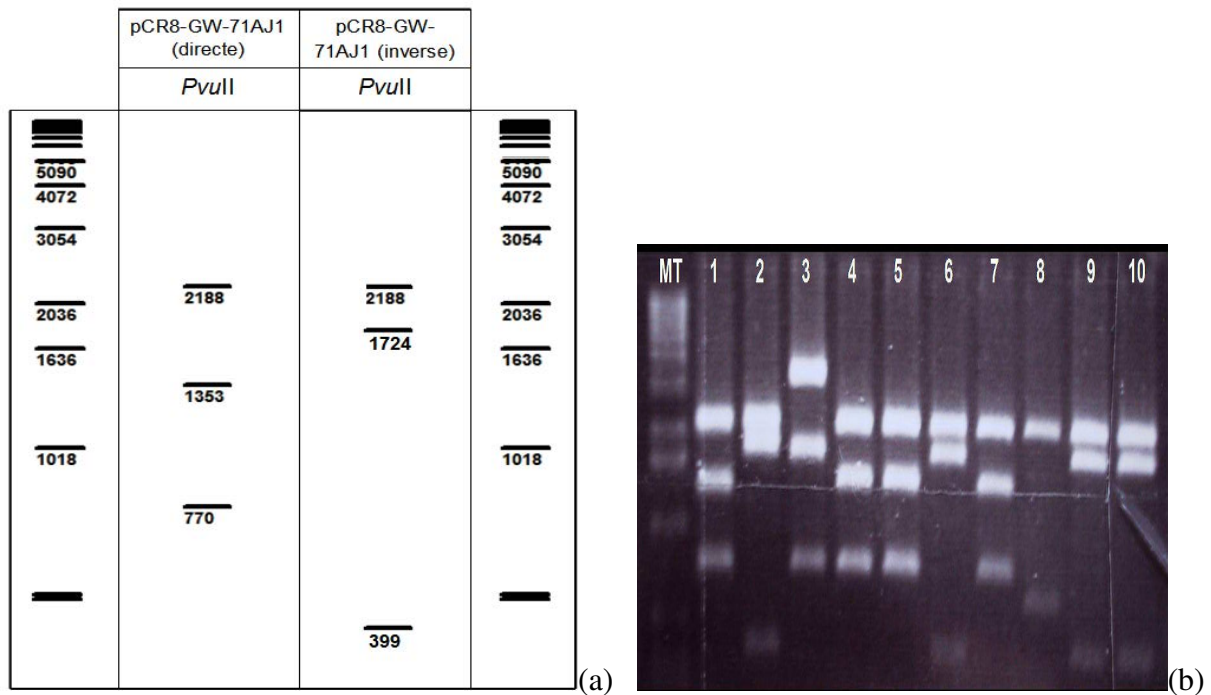


Figure 54 : (a) Profils de digestions théoriques des plasmides pCR8-GW-71AJ1 que l'on obtient en fonction de l'orientation du gène codant CYP71AJ1, digérés par l'enzyme de restriction *PvuII*, comparés au marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Invitrogen). pCR8-GW-71AJ1 (directe) est le plasmide ayant le gène dans la bonne orientation, et pCR8-GW-71AJ1 (inverse) est le plasmide ayant le gène dans la mauvaise orientation. (b) Profils de digestions des supposés plasmides pCR8-GW-71AJ1 digérés par l'enzyme de restriction *PvuII* (puits 1 à 10) comparés au marqueur de taille (MT) 1Kb DNA Ladder (Invitrogen).

5.2 Obtention des transformants S-71AJ1

Le protocole de transformation est similaire à celui utilisé dans les paragraphes précédents. De plus, pour les mêmes raisons énoncées dans les autres paragraphes (assèchement des hypocotyles) nous avons travaillé sur 100 explants à la fois. Les tiges feuillées d'environ 1 cm ont été repiquées sur un nouveau milieu sélectif pour une période minimale d'un mois (Figure 55). Celles qui n'ont pas blanchi sont alors multipliées sur un milieu MS(30).

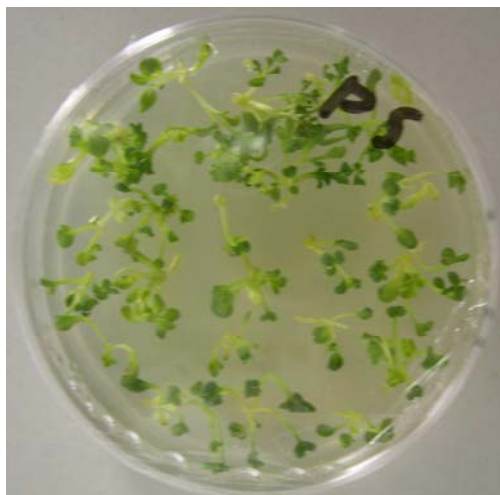


Figure 55 : Tiges feuillées de rues potentiellement transformées avec la construction 35S::71AJ1 cultivées en *in vitro*.

15 plantes potentiellement transgéniques et issues d'évènements de transformation différents ont été étudiées. Comme précédemment, ces plantes ont été analysées d'un point de vue moléculaire (présence et niveau d'expression du transgène, niveau d'expression des gènes *cyp73A32*, *cyp98A22* et *cyp71AJ1*) et métabolique (analyse de composés phénylpropanoïdes).

5.3 Caractérisation moléculaire des transformants S-71AJ1

Pour certifier l'intégration totale de l'ADN-T au sein du génome des plantes, et donc du transgène, deux types d'amplifications par PCR ont été réalisés. La première consiste à mettre en évidence la présence du gène *nptII* par PCR avec les amorces NptDIR et NptREV. La seconde amplification permet de mettre en évidence l'intégration du gène *cyp71AJ1*. Contrairement aux séries de plantes transgéniques K-73A32, S-98A22 et S-98A22INV l'utilisation d'amorces internes permet la mise en évidence du gène *cyp71AJ1* intégré lors de la transformation génétique. En effet, ce transgène est originaire d'*Ammi majus* et nous avons vérifié au laboratoire qu'il était impossible de le mettre en évidence par une approche PCR à partir d'amorces dégénérées chez des rues sauvages. La mise en évidence du transgène 35S::*cyp71AJ1* a été réalisée par PCR en utilisant les amorces Am71ADIR 5'-CGGTACCATGAAGATGCTGGAAC AGAAT-3' et 71AJ1REVint 5'-CTCGCTTCTCCAG GAACTAGTAG-3' s'hybridant spécifiquement à 56°C.

Les tailles attendues des produits de PCR sont de 500 et 790 pb respectivement pour le gène codant pour le transgène et le gène *nptII*. Pour chaque série d'amplification les témoins nécessaires ont été effectués (Cf paragraphes précédents). Les résultats d'amplification pour chaque plante supposée transformée sont donnés dans le tableau 14.

Souche de <i>R. graveolens</i>			Souche de <i>R. graveolens</i>		
	<i>nptII</i>	<i>35S::cyp71AJ1</i>		<i>nptII</i>	<i>35S::cyp71AJ1</i>
S-71AJ1-1	+	+	S-71AJ1-9	+	+
S-71AJ1-2	+	+	S-71AJ1-12	+	+
S-71AJ1-3	+	+	S-71AJ1-13	+	+
S-71AJ1-4	+	+	S-71AJ1-16	+	+
S-71AJ1-5	+	+	S-71AJ1-18	+	+
S-71AJ1-6	+	+	S-71AJ1-21	+	+
S-71AJ1-7	+	+	S-71AJ1-23	+	+
S-71AJ1-8	+	+			

Tableau 14 : Résultats de l'amplification des gènes *nptII* et *35S::cyp71AJ1* sur de l'ADN génomique extrait de feuilles de rue. (+) signifie que l'amplification a bien eu lieu et que l'amplicon est de taille attendu. (-) signifie qu'il n'y a pas eu d'amplification.

Les résultats obtenus démontrent que sur les 15 individus testés et potentiellement transformés car résistants à la kanamycine, tous le sont avec l'ADN-T inséré en entier dans l'ADN génomique. De plus, l'absence de contamination bactérienne a été confirmée par le test de mise en culture de feuilles de rue dans un milieu nutritif YEB.

5.4 Dosage des phénylpropanoïdes

Chaque plante transgénique a subi plusieurs prélèvements de matériel végétal pour l'extraction des phénylpropanoïdes. Pour vérifier l'exactitude des résultats, les prélèvements

ont été réalisés à des périodes différentes. Certains transformants ont subi simultanément un prélèvement de matériel végétal pour l'extraction de composés phénylpropanoïdes et un second pour l'extraction des ARNs totaux. Ces ARNs ont permis la quantification des transcrits C4H, C3'H et PS (Psoralène synthase). Le fait de réaliser ces deux prélèvements en même temps, sur la même plante, nous a permis de corréler la concentration en furocoumarines et des autres composés analysés qualitativement, au niveau d'expression des gènes *cyp73A32*, *cyp98A22* et *cyp71AJ1*. Afin de comparer efficacement les deux populations de rues témoins et de rues transformées, le dosage des divers composés par HPLC (psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine) a été réalisé en un seul passage et en doublon. Cela permet de vérifier d'une part le bon fonctionnement de l'appareil, et d'autre part l'exactitude des valeurs pouvant sembler anormales.

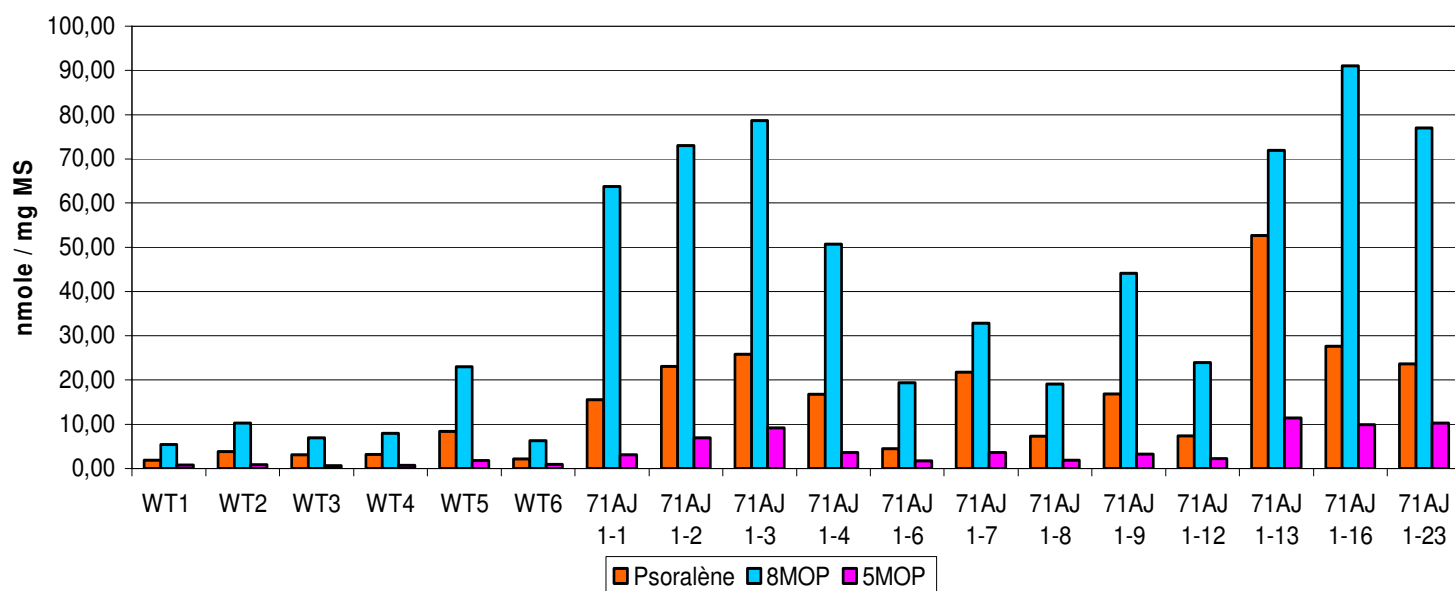


Figure 56 : Dosage de trois furocoumarines (psoralène, 8-MOP et 5-MOP) extraites à partir d'un échantillon de rues témoins et de rues transformées avec le gène codant pour la PS d'*A. majus* exprimées en nmole par mg de matière sèche.

Les résultats décrits sur la figure 56 correspondent au dosage des furocoumarines chez 6 plantes non transformées (WT) et chez 12 transformants (S-71AJ1). Les résultats de l'analyse statistique (test de Student) qui en a découlé sont consignés sur la figure 57. Ces résultats indiquent clairement qu'il y a une différence significative entre les plantes

transgéniques S-71AJ1 et les plantes sauvages concernant la composition en psoralène, en 8-MOP et en 5-MOP.

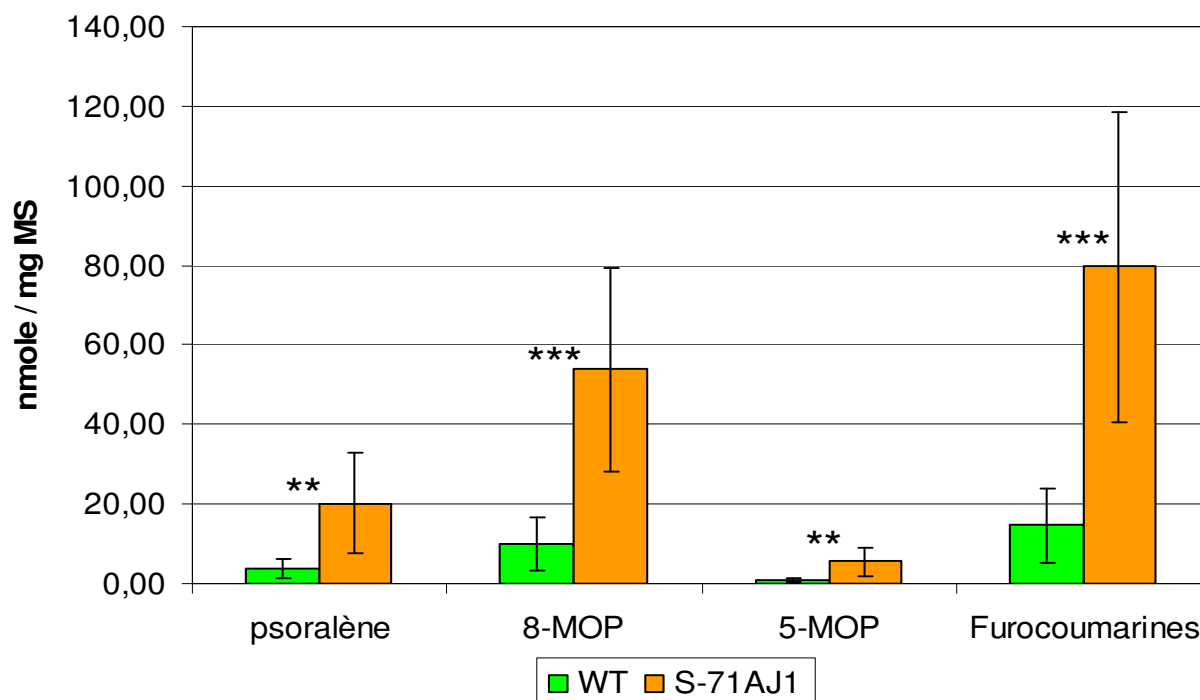


Figure 57 : Valeurs moyennes exprimées en nmole par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP et furocoumarines (valeurs cumulées des trois précédents) dosées dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec le gène codant pour la Psoralène Synthase d'*A. majus*. ** : différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les deux échantillons. * : différence très hautement significative ($p < 0,001$).**

L'analyse des teneurs en furocoumarines a été complétée par celle de la rutine, du ferulate, de l'umbelliférone et de la scopolétine pour 6 plantes témoins (WT) et pour 15 transformants (S-71AJ1). La représentation graphique simultanée de l'ensemble des phénylpropanoïdes analysés a nécessité l'utilisation d'une échelle exprimée en unités arbitraires. Les résultats sont représentés sur la figure 58.

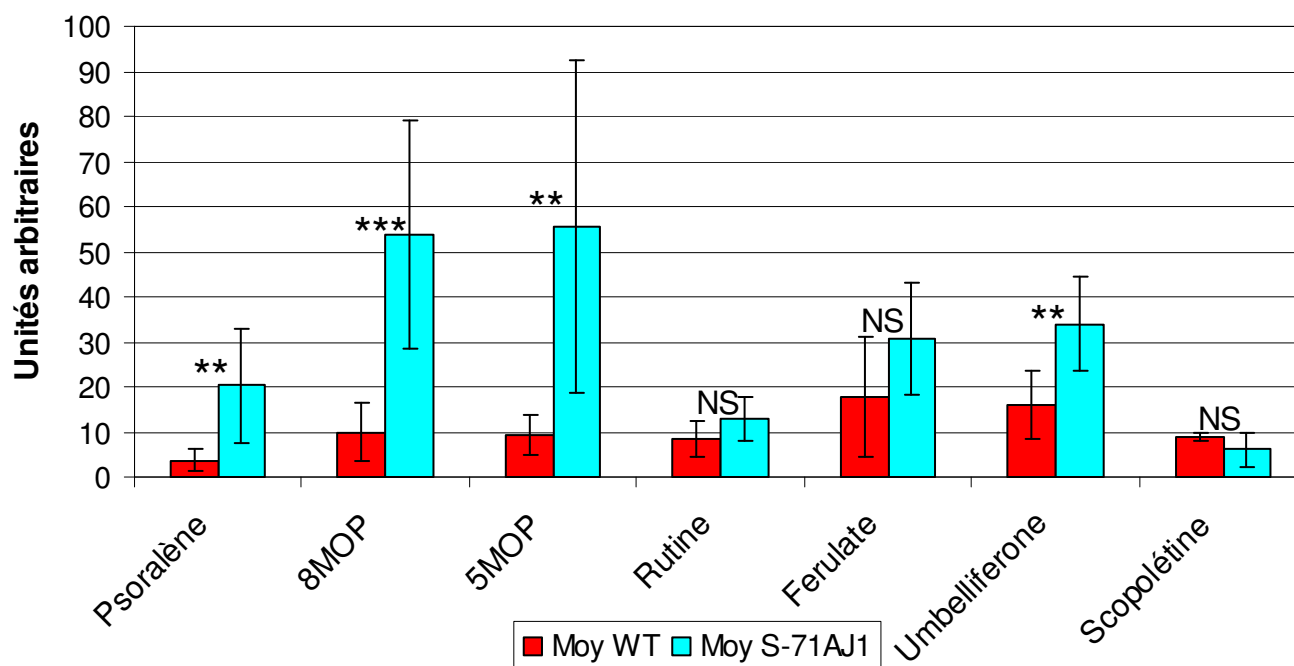


Figure 58 : Valeurs moyennes exprimées en unités arbitraires par mg de matière sèche de psoralène, 8-MOP, 5-MOP, rutine, ferulate, umbelliférone et scopolétine dosés dans un échantillon de rues témoins ainsi que dans l'ensemble des rues transformées avec le gène codant pour la PS d'*A.majus*. NS : pas de différences significatives observées ($p=0,05$) entre les deux échantillons. ** : différence hautement significative ($p<0,01$). *** : différence hautement très significative ($p<0,001$).

Ces résultats nous indiquent qu'une différence hautement significative dans la teneur en umbelliférone est observée entre les deux échantillons. Une augmentation d'un facteur 2 est constatée sur la teneur en umbelliférone des transformants, molécule qui fait partie de la voie de biosynthèse des furocoumarines.

Par contre, les tests statistiques réalisés sur la rutine, le ferulate et la scopolétine, molécules en dehors de la voie de biosynthèse des furocoumarines, suggèrent que les deux échantillons appartiennent à deux populations ayant la même moyenne. La transformation de rue avec la construction *35S::cyp71AJ1* n'aurait donc pas d'effet sur la teneur en rutine, ferulate et scopolétine.

5.5 Quantification du nombre de transcrit C4H, C3'H, et PS

L'insertion du gène codant pour la psoralène synthase d'*A. majus* chez *R. graveolens* permet une augmentation de l'ordre de 300% de la teneur en furocoumarines. Comme cela a été vérifié chez les quatre autres familles de transformants, nous avons voulu voir s'il existait une corrélation entre cette augmentation et le niveau transcriptionnel C4H, C3'H et PS. La vérification de l'efficacité de transcription du transgène a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques au gène *cyp71AJ1*.

5.5.1 Choix des amorces

Après avoir réalisé les différents tests adéquats, nous avons choisi les couples d'amorces 16Sdir ; 16Srev, RtC4Hfor1 ; RtC4Hrev1 , RT98A22-DIR1 ; RT98A22-REV1 et RT71AJ1DIR869 ; RT71AJ1REV968 pour amplifier respectivement une séquence de l'ARN ribosomal, du gène *cyp73A32*, du gène *cyp98A22* et du gène *cyp71AJ1*.

Amorce	séquence
26Sdir	5'-GGGCGAAGCCAGAGGAAAC-3'
26Srev	5'-ACGAACGATTTGCACGTCAGT-3'
RtC4Hfor1	5'-TCAAATCACCGAGCCTGACA-3'
RtC4Hrev1	5'-CATCCTGAGGCGGAGAGTCT-3'
RT98A22-DIR1	5'-GAGGTTGCACCCACCAACTC-3'
RT98A22-REV1	5'-CACCTATCTTGACGTTGGCGT-3'
RT71AJ1DIR869	5'-TCTGGGATATGTTGGGTGCCGGA-3'
RT71AJ1REV968	5'-TGCAATTTGAACATGGCGTCC-3'

Tableau 15 : amorces utilisées en PCR quantitative.

5.5.2 Comportement des gènes C4H, C3'H et PS au niveau transcriptionnel

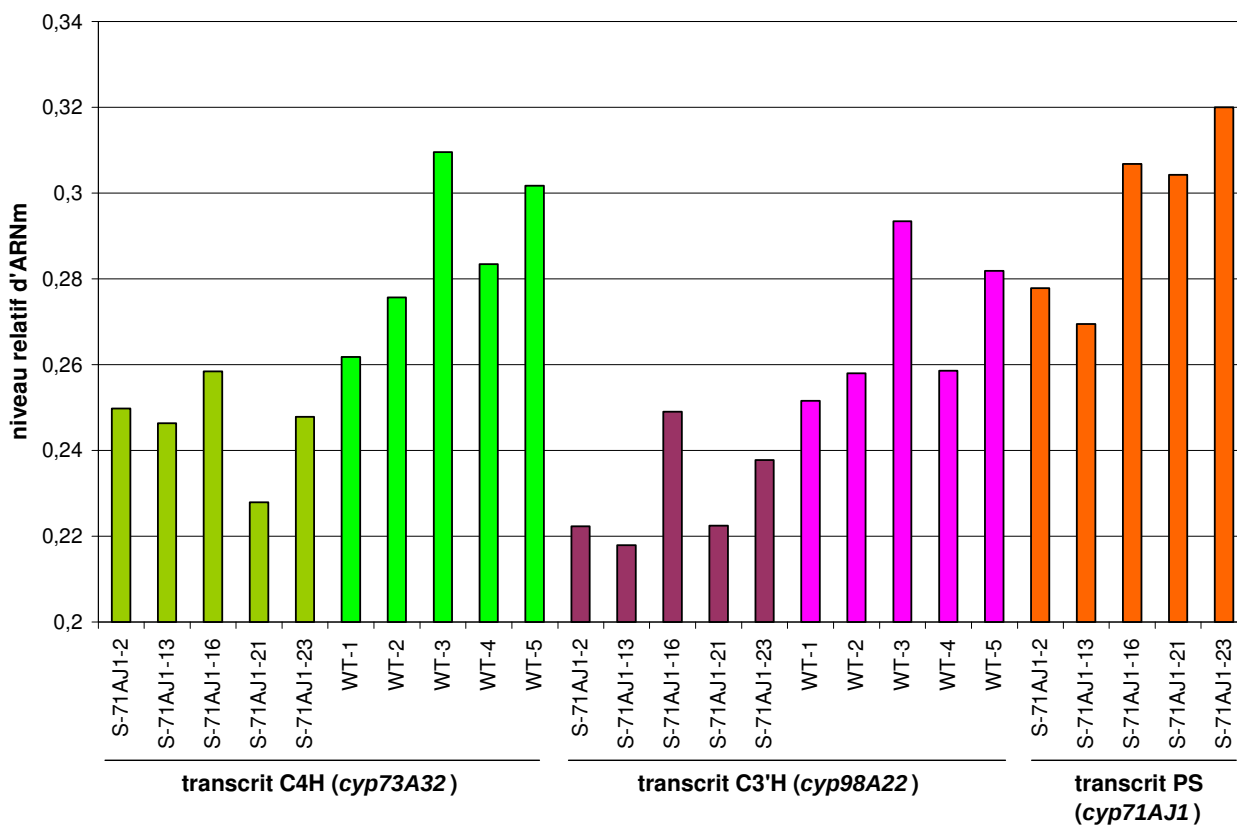


Figure 59 : Niveaux relatifs des transcrits C4H, C3'H (*cyp98A22*) et PS obtenus par analyse en RT-PCR en temps réel pour un échantillon de rues témoins (WT) et de plantes transgéniques (S-71AJ1).

Comme pour les séries de plantes transgéniques S-98A22, S-98A3 et S-98A22INV, nous nous sommes limités à caractériser 5 transformants S-71AJ1 (numéros 2, 13, 16, 21 et 23) et 5 rues témoins. Les 5 rues génétiquement transformées ont été choisies pour leur forte teneur en furocoumarines. Au cours de l'analyse, un duplicata est réalisé pour chaque échantillon. Les niveaux relatifs de transcrits C4H, C3'H et PS sont représentés graphiquement pour chaque individu analysé en figure 62. De plus un test T est réalisé entre la série de plantes transgéniques et de témoins pour chaque type de transcrit.

Les résultats ont montré une différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les transformants S-71AJ1 et les rues témoins pour ce qui est du nombre de transcrits C4H et C3'H. En effet, une diminution globale du nombre de ces transcrits a été observée chez la

série de plantes transgéniques caractérisée. De plus, l'utilisation de la PCR en temps réel pour la détection fine de transcrits PS a montré que le transgène s'exprimait bien dans les 5 échantillons testés. Toutefois, il n'existe aucune corrélation entre le niveau d'expression du gène *cyp71AJ1* et la teneur en furocoumarines

Chapitre IV : DISCUSSION

Au cours de ce travail de thèse nous avons abordé l'étude du métabolisme secondaire de *Ruta graveolens*. La voie de biosynthèse des furocoumarines, et plus globalement celle des phénylpropanoïdes, ont été les cibles de ces recherches. Les furocoumarines sont des molécules remarquables utilisées par l'industrie pharmaceutique. Leur utilisation en PUVA thérapie depuis les années 70 en est un exemple concret. Deux objectifs conjoints ont été menés tout au long de ces travaux. Le premier a été l'obtention de plantes génétiquement modifiées ayant la capacité de produire une quantité plus ou moins importante de furocoumarines par rapport à des rues sauvages. Le second, d'ordre plus académique, a été de tenter d'avancer dans la compréhension de la régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Pour satisfaire nos objectifs nous avons utilisé une approche de type génie métabolique. La Cinnamate 4-Hydroxylase a été la première enzyme de rue connue et caractérisée au laboratoire appartenant à la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Gravot *et al.* 2004). Cette enzyme est située en amont de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Le gène *cyp73A32* codant pour la C4H a été le premier utilisé pour essayer de modifier qualitativement ou quantitativement la voie de synthèse des furocoumarines.

Les travaux concernant les transformants K-73A32 ont été initiés par Karine Lièvre au cours de sa thèse. Ces travaux ont consisté à identifier un certain nombre de plantes génétiquement transformées par PCR et Southern blot, puis à doser les teneurs en furocoumarines. Les résultats décrits dans sa thèse (Lièvre 2004) ont permis de montrer qu'il y avait une modification de la qualité des furocoumarines produites. Chez ces plantes, les analyses métaboliques ont montré que les teneurs relatives en dérivés méthoxylés (bergaptène et xanthotoxine) par rapport au psoralène sont supérieures à celles retrouvées chez les rues témoins ($p=0,03$ et $p=0,01$). En revanche, le rapport entre la teneur en xanthotoxine et celle du bergaptène est globalement le même chez ces deux types de plantes : environ 4 moles de xanthotoxine pour 1 de bergaptène.

Afin d'affiner et de corrélérer ces résultats au niveau d'expression du transgène, ces plantes ont fait l'objet d'études complémentaires. Les résultats obtenus et décrits dans le chapitre précédent ne confirment pas les résultats initiaux. L'ensemble des résultats observés

pour les plantes transgéniques K-73A32, mais aussi pour l'ensemble des transformants, est résumé dans le tableau 16.

Famille	Evolution par rapport à l'ensemble des rues témoins de la teneur en :						Evolution des transcrits	
	Furoc.	Umb.	Scopo.	Ferulate	Rutine	unité H	C4H	C3'H
K-73A32	=	=	=	=	=	Pas de données	=	=
S-98A22	↑	↓	=	=	↓	=	=	↑
S-98A3	↑	↑	↑	=	=	Pas de données	=	=
S-98A22INV	=	=	=	=	=	↑	↓	=
S-71AJ1	↑	↑	=	=	=	Pas de données	↓	↓

Tableau 16 : principales modifications observées au niveau des concentrations en composés phénoliques ainsi qu'au niveau transcriptionnel pour chaque famille de transformants obtenus. = : pas de différences significatives avec les plantes témoins. ↑ (↓): augmentation (diminution) statistiquement significative de la teneur par rapport aux plantes témoins.

Notre étude complémentaire montre que les plantes repiquées plusieurs fois et maintenues *in vitro* pendant 2 ans ont subi des modifications métaboliques. En effet, les expérimentations n'ont pas permis de voir une différence notable de la quantité et de la qualité de furocoumarines, malgré la confirmation de la présence du transgène. Par ailleurs, une analyse du niveau d'expression du transcrit *cyp73A32* indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement observables entre les plantes sauvages et les plantes supposées surexprimer le transgène. Les différences de résultats entre les premières générations de plantes de Lièvre et les générations ultérieures pourraient s'expliquer par la mise en place d'un phénomène de "gene silencing" (Muskens *et al.* 2000 ; Tang *et al.* 2006). Cette hypothèse va dans le sens des observations faites par Blee et ses collaborateurs (Blee *et al.* 2001). Ces auteurs ont montré que chez des tabacs transformés par un gène codant pour la C4H de haricot (CYP73A15) placé sous contrôle du promoteur 35S, il y avait une modification de l'évolution dans la teneur en lignine totale au cours du temps. Les observations indiquent que la lignification est retardée. Il est possible que l'absence de persistance dans le temps des résultats initiaux observés chez les transformants K-73A32 soit un phénomène analogue à celui mis en

évidence par Blee. Cette hypothèse est d'autant plus plausible dans la mesure où il ne faut pas oublier le caractère toxique des furocoumarines.

Il faut également préciser que parmi toutes les plantes, nous n'avons conservé pour les analyses que celles qui se multipliaient bien *in vitro*. Or, des auteurs ont montré que les mutants *ref3* d'*A.thaliana*, plantes knock out pour le gène codant la C4H, présentaient une architecture fortement altérée (nanisme et forte ramification) (Bell-Lelong *et al.* 1997b ; Ruegger and Chapple 2001 ; Goujon *et al.* 2003). En tenant compte de ces éléments, il est envisageable que les plantes que nous n'avons pas pu analyser (Cf paragraphe 1.2 chapitre III) soient des plantes intéressantes quant à l'expression (sur ou sous expression) de *cyp73A32*.

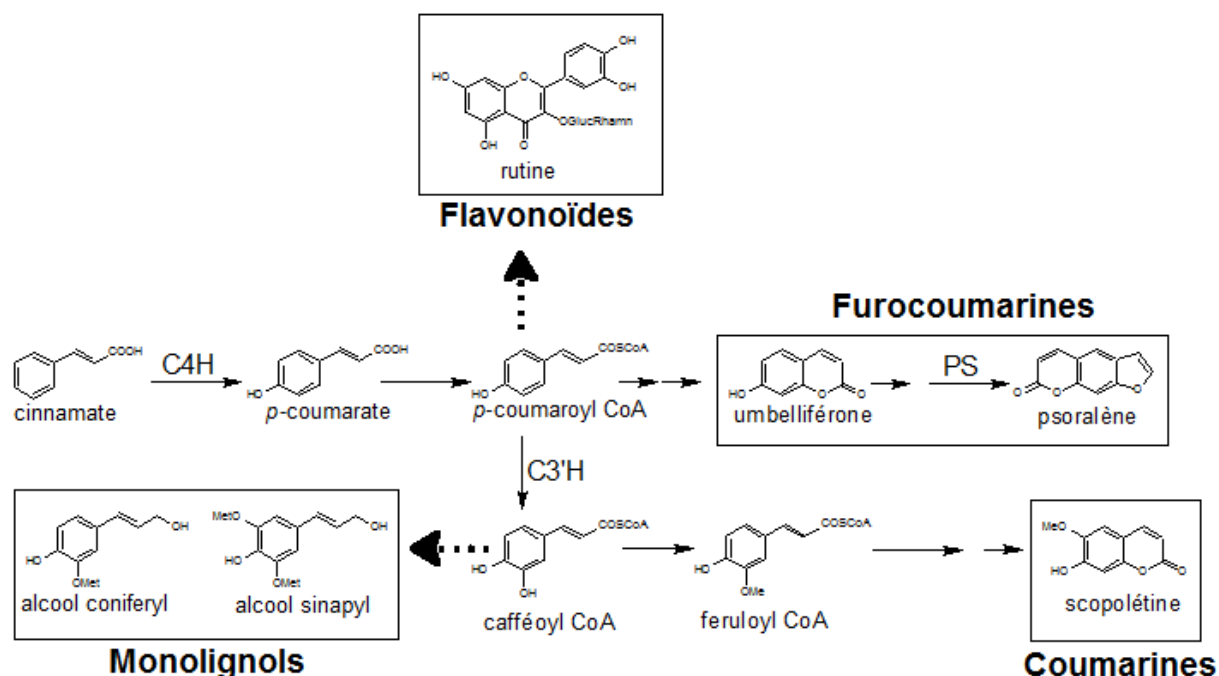


Figure 60 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. C4H : Cinnamate 4-Hydroxylase ; C3'H : ester de Coumaroyl 3'-Hydroxylase ; PS : Psoralène Synthase.

L'ensemble des analyses réalisées sur les transformants K-73A32 a montré les limites de l'utilisation du gène codant pour la C4H (enzyme la plus en amont de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes) pour obtenir une augmentation significative de la teneur en furocoumarines. Suite à l'absence de résultats probants, d'autres approches pourraient être envisagées comme par exemple l'utilisation de promoteurs inductibles. Mais, nous avons choisi de nous réorienter vers d'autres gènes. En se basant sur les études publiées par

Abdulrazzak (Abdulrazzak *et al.* 2006) et Franke (Franke *et al.* 2002a), nous nous sommes intéressés à un autre cytochrome P450 (la C3'H) dont l'action se situe après l'embranchement des furocoumarines et à partir de laquelle commence la voie de synthèse des lignines (Figure 63). Ces deux auteurs ont montré le rôle prépondérant de cette enzyme dans le développement cellulaire et la croissance des plantes, *via* la synthèse de précurseurs phénoliques. Ces données bibliographiques laissent à penser qu'une stimulation générale des voies métaboliques de *R. graveolens* (fort développement, forte croissance) pourraient conduire à une stimulation de la voie de biosynthèse des furocoumarines en particulier. Le gène *cyp98A22* de rue codant pour une C3'H a été cloné et caractérisé au laboratoire. Ce gène a été choisi pour poursuivre nos travaux de génie métabolique.

Dès les premières étapes de la transformation génétique nous avons pu constater une différence phénotypique notable entre les plantes transgéniques S-98A22 et toutes les plantes générées jusque là au laboratoire (K-73A32, GUS, GFP (Thèse K. lièvre)). Cette différence s'est caractérisée par un renflement et un bourgeonnement accru des hypocotyles, mais également par la production d'une odeur âcre souvent observée lors du broyage de plants de rue. Cette odeur, bien plus importante dans le cas des transformants S-98A22, peut être mise en relation avec la production de métabolites secondaires volatiles dans la plante et laisse présager d'un bouleversement majeur dans la synthèse de ces molécules.

Les premiers résultats obtenus concernent le dosage de la teneur en furocoumarines de chaque plante transformée. Ces résultats ont été sans équivoque : la transformation génétique de *Ruta graveolens* avec la construction 35S::98A22 engendre une augmentation d'un facteur 3 de la teneur en psoralène, bergaptène et xanthotoxine. Une analyse plus large des métabolites produits dans les plantes obtenues indique qu'il n'y a pas une stimulation générale du métabolisme secondaire. Nous avons pu constater une diminution significative dans les teneurs en rutine et en umbelliférone chez les rues transformées. La réduction d'un facteur 2 en rutine suggère que l'augmentation de la teneur en furocoumarines des transformants pourrait se faire au détriment de certains flavonoïdes (rutine). Par contre, la réduction d'un facteur 3 en umbelliférone pourrait suggérer que sa formation serait une étape limitante de la voie de biosynthèse des furocoumarines. Toutefois, aucune différence dans la teneur en scopolétine n'a été constatée entre les deux populations de plantes testées. Ces résultats ne vont pas dans le sens de l'étude de Kai et de ses collaborateurs (Kai *et al.* 2006) qui ont montré que chez l'arabette, la production de scopolétine est tributaire de l'activité

C3'H. On aurait donc pu s'attendre à ce que les transformants S-98A22 produisent plus de scopolétine.

Par contre, l'ensemble de nos résultats va dans le sens des études publiées par Abdulrazzak (Abdulrazzak *et al.* 2006) et Franke (Franke *et al.* 2002a). Il semblerait qu'une augmentation du flux de la voie de biosynthèse vers la lignine engendrerait un rétrocontrôle positif sur les étapes en amont de la *meta*-hydroxylation. Ainsi, la voie de biosynthèse des furocoumarines serait stimulée. Toutefois, nos résultats ne permettent pas de définir la nature de ces régulations (transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, enzymatique). La seule donnée dont nous disposons est que cette stimulation de la synthèse des dérivés du psoralène se fait au détriment du pool d'umbelliférone et de rutine. Notons par ailleurs que cette diminution de la teneur en umbelliférone qui est du même ordre de grandeur que l'augmentation des furocoumarines dosées, pourrait être le reflet d'une augmentation de flux.

L'augmentation de la teneur en furocoumarines et l'absence de différence significative dans la teneur en scopolétine nous ont amené à nous demander si ces résultats étaient imputés à la surexpression spécifique de la C3'H de rue. Pour vérifier cela, nous avons entrepris la transformation d'hypocotyles de rue avec le gène *cyp98A3* codant pour la C3'H d'*A. thaliana*, plante qui ne produit pas de furocoumarines. Le choix de cette enzyme a été guidé par les travaux de Kai, qui ont montré son importance dans la synthèse de scopolétine (Kai *et al.* 2006).

Les rues qui ont été transformées avec le gène codant pour la C3'H de l'arabette présentent, tout comme les plantes transgéniques S-98A22, ce trait caractéristique de l'odeur âcre qui se dégage dès l'ouverture des pots de culture *in vitro*. Ce phénotype, tout comme le renflement et le bougeonnement accru des hypocotyles, laisse présager une dérégulation importante du métabolisme secondaire des transformants S-98A3. Une analyse plus fine de la teneur en certains phénylpropanoïdes a cependant mis en exergue une différence majeure entre plantes témoins et transgéniques (S-98A3). Si les plantes transformées avec le gène *cyp98A22* sous-produisent de l'umbelliférone par rapport aux plantes sauvages, les plantes transgéniques S-98A3 présentent des teneurs en scopolétine et en umbelliférone nettement supérieures. Comme les transformants S-98A22, une augmentation d'un facteur 3 de la teneur en furocoumarines a été observée.

L'ensemble des résultats obtenus pour les transformants S-98A22 et S-98A3 nous indique que pour le même effet (augmentation de la teneur en furocoumarines libres), deux mécanismes de régulation différents pourraient s'être mis en place. Ces conclusions peuvent sembler surprenantes lorsque l'on sait que *cyp98A3* et *cyp98A22* sont deux gènes qui codent pour des enzymes qui sont très proches. Des études faites *in vitro* ont permis de mettre en évidence que, d'un point de vue biochimique, la spécificité de substrat est nettement différente. En effet, si CYP98A3, lorsqu'il est exprimé dans un système hétérologue, est en mesure de métaboliser les esters de *p*-coumaroyl shikimate et quinate (Schoch *et al.* 2001), CYP98A22 ne peut transformer que les esters de *p*-coumaroyl shikimate (Hehn 2007). Des observations similaires ont été réalisées sur CYP98A36, un P450 isolé de *Coffea canephora* chez qui deux CYP98A cohabitent (A35 et A36) et sont exprimés différemment d'un point de vue spatio temporel (Mahesh *et al.* 2007). Cette variabilité de substrat et d'affinité est un phénomène bien connu pour cette famille d'enzymes puisqu'une étude allant dans ce sens a été réalisée par Morant (Morant *et al.* 2007). Par ailleurs, les travaux de Kai (Kai *et al.* 2006) démontrent que la C3'H d'*A. thaliana* (CYP98A3) intervient dans la synthèse de scopolétine, celle-ci étant biosynthétisée *via* une *ortho*-hydroxylation de feruloyl-CoA (Kai *et al.* 2008). A partir des données bibliographiques et de l'ensemble des résultats, il semble donc possible qu'une seconde C3'H soit impliquée chez *Ruta graveolens* dans la production de scopolétine (Figure 64). Ainsi, c'est l'ester de *p*-coumaroyl quinate qui serait le seul précurseur de la synthèse de scopolétine. Chaque C3'H aurait alors un substrat particulier : une première (CYP98A22) qui métabolise uniquement le *p*-coumaroyl shikimate, et une seconde qui métaboliserait notamment le *p*-coumaroyl quinate nécessaire à la synthèse de scopolétine.

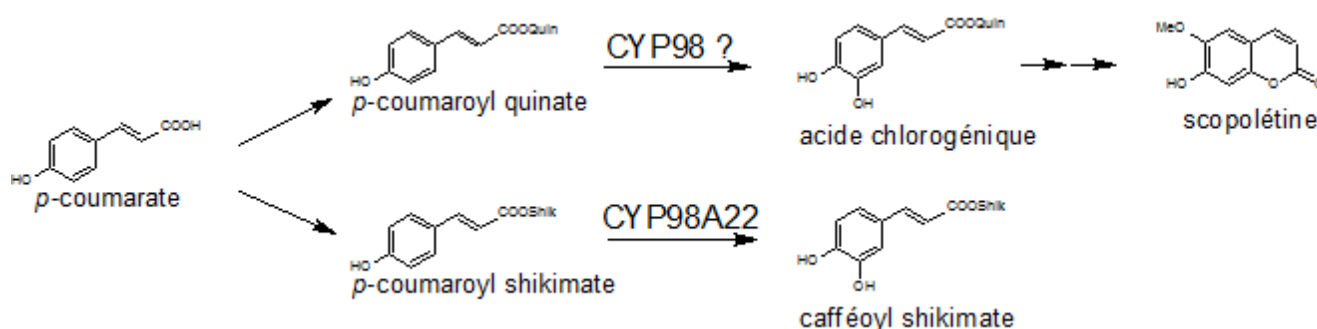


Figure 61 : Représentation hypothétique de la métabolisation du *p*-coumarate chez *R. graveolens*.

Afin de mieux comprendre le rôle de CYP98A22 dans le métabolisme secondaire de la rue, nous avons voulu étudier des plantes qui n'expriment plus ce gène. Pour cela nous avons construit des plantes antisens pour l'intégralité du gène. Cette approche aurait dû nous permettre d'inhiber spécifiquement l'expression de CYP98A22. Les nouvelles plantes ainsi obtenues ne présentaient pas de phénotype visible particulier. L'analyse métabolique de cette nouvelle série de transformants n'a pas révélé de différences significatives dans la teneur des différentes molécules testées par rapport aux rues sauvages. Néanmoins, une analyse fine de la teneur en unités H, G et S a montré qu'il y avait une modification significative de la qualité de la lignine. Un enrichissement en unités H est observé dans les transformants S-98A22INV. Ces observations vont dans le sens des résultats obtenus par Franke et Abdulrazzak (Franke *et al.* 2002a ; Abdulrazzak *et al.* 2006). En se basant sur ces deux études, nous nous attendions à une diminution très nette du niveau d'expression du gène *cyp98A22*. Or, l'analyse par PCR en temps réel a montré qu'il n'y avait qu'une diminution de la quantité de transcrits *cyp73A32*. Cette diminution pourrait être la conséquence d'un rétrocontrôle négatif de la sous expression de l'enzyme CYP98A22 bien que nous n'ayons pas de données expérimentales permettant de le confirmer. Il est vraisemblable que la stratégie antisens n'était pas une approche adaptée dans notre cas. Une approche RNAi pourrait être envisagée pour répondre à ces questions.

Dans tous les cas, ces résultats indiquent qu'il est possible de moduler le niveau de synthèse des furocoumarines dans la rue par une approche de génie métabolique. Cependant cette régulation est très complexe et l'utilisation de gènes comme la C3'H engendre une dérégulation élargie à l'ensemble de la voie des phénylpropanoïdes.

Dans l'optique de générer des plantes qui ne sont affectées que pour la synthèse de furocoumarines, nous avons entrepris la construction de rues surexprimant le gène *cyp71AJ1* de la psoralène synthase d'*Ammi majus*. Ce gène, qui a été identifié par Larbat et ses collaborateurs (Larbat *et al.* 2007), n'a été mis à disposition que très tardivement au cours de la thèse. Il présente l'avantage de ne pas être issu de *Ruta graveolens* et pourrait donc être moins soumis à une régulation de gene silencing. D'autre part, il s'agit d'un gène spécifiquement impliqué dans la voie de biosynthèse des furocoumarines.

Aucune modification métabolique visible n'a été observée chez cette série de plantes transgéniques S-71AJ1. La production de l'odeur âcre décrite pour les transformants S-98A3

et S-98A22 n'a pas été relevée, ce qui sous entend une dérégulation moins importante du métabolisme secondaire. Par contre, les résultats obtenus concernant l'analyse métabolique sont tout aussi remarquables que ceux observés chez les transformants S-98A22 et S-98A3. Une augmentation moyenne d'un facteur 4 de la teneur en furocoumarine chez les individus S-71AJ1 a été constatée. Ainsi, ces rues transformées présentent une quantité globale de furocoumarines libres (psoralène, bergaptène, xanthotoxine) de l'ordre de 80 nmole / mg de matière sèche, alors que les rues témoins que nous avons au laboratoire n'en contiennent que 20 nmole / mg de MS. De même, une augmentation d'un facteur 2 de la teneur en umbelliférone a été observée. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre plantes témoins et transgéniques pour les teneurs en rutine, en ferulate et en scopolétine. Ces résultats indiquent que grâce à cette enzyme nous avons pu cibler plus spécifiquement la voie de biosynthèse qui nous intéresse.

Parallèlement à ces analyses métaboliques, nous avons voulu voir s'il existait une corrélation entre l'augmentation de la teneur en furocoumarines et le niveau transcriptionnel des gènes *cyp73A32*, *cyp98A22* et *cyp71AJ1*. Ces analyses ont montré d'une part que le transgène *35S::cyp71AJ1* est transcrit dans toutes les plantes transgéniques caractérisées et d'autre part, qu'il existe une diminution du niveau relatif d'ARNm C4H et C3'H en comparaison avec les rues témoins. Plusieurs études ont montré que la régulation de l'activité C4H est essentiellement de nature transcriptionnelle (Weisshaar and Jenkins 1998), et qu'il y a accumulation d'ARNm C4H dans les cellules soumises à un stress (Mizutani *et al.* 1997; Betz *et al.* 2001; Ro *et al.* 2001). A l'inverse, une quantité importante de furocoumarines pourrait exercer un rétrocontrôle négatif de nature transcriptionnelle sur le gène *cyp73A32*. De même, cette régulation semblerait avoir lieu sur le gène *cyp98A22*. En effet, les enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont régulées par les facteurs de transcription de type R2R3 MYB (Stracke *et al.* 2001 ; Boudet 2007).

Par génie métabolique, il est donc possible de surexprimer un gène spécifique d'une voie métabolique afin d'obtenir une surproduction de ces dits métabolites. De la même manière, Frick et son équipe (Frick and Kutchan 2006) ont réussi par cette technique à augmenter la teneur en alcaloïdes morphiniques dans le latex de *Papaver somniferum* L. de l'ordre de 450 %.

Conclusion générale et perspectives

Le génie métabolique appliqué aux plantes médicinales ouvre un champ d'investigation important. Notre étude a montré très clairement qu'il est possible de stimuler une voie de biosynthèse *via* l'expression constitutive d'un gène n'appartenant pas forcément à cette voie de synthèse. En effet, la transformation génétique de *R. graveolens* avec un gène codant pour la C3'H de rue a conduit à une augmentation de la teneur en furocoumarines d'un facteur 3. Il est intéressant de constater qu'une surproduction de même amplitude est mise en évidence lorsque les rues sont transformées avec un gène codant pour la même enzyme, mais isolé à partir d'une plante ne produisant pas de furocoumarines, comme *Arabidopsis thaliana*. Cette dérégulation globale du métabolisme secondaire valide la portée et l'intérêt des approches de génie métabolique.

La dernière partie de cette étude a consisté à surexprimer un gène isolé à partir d'une autre plante productrice de furocoumarines (*Ammi majus*). Ce gène spécifique à cette voie de biosynthèse métabolise la marmésine en psoralène. L'utilisation de ce gène a permis d'augmenter, de manière plus considérable, la teneur en furocoumarine (X4). Dès lors qu'une autre enzyme spécifique à la voie de synthèse des furocoumarines sera clonée, il serait intéressant de transformer génétiquement *Ruta graveolens* pour voir s'il est possible d'augmenter encore plus fortement la concentration en furocoumarine *in planta*.

L'étape suivante consisterait alors à moduler la voie de biosynthèse de sorte à générer des chimiotypes produisant une furocoumarine spécifique. En effet, en France le seul princeps encore utilisé en P-UVA thérapie pour soigner des maladies de peau comme le psoriasis et le vitiligo est la Méladinine® (DCI : Méthoxalène = xanthotoxine = 8-MOP). Des plantes transgéniques ne produisant que de la xanthotoxine en forte concentration auraient un intérêt certain pour des entreprises pharmaceutiques. Pour atteindre cet objectif, il faudra néanmoins isoler les gènes permettant la synthèse de 8-MOP.

Cette étude a montré qu'il n'est pas nécessaire de connaître les gènes spécifiques d'une voie de biosynthèse pour pouvoir la stimuler. L'utilisation d'un gène non spécifique

d'une voie de synthèse (comme celui codant la C3'H) pourrait donc suffire à obtenir une plante surproduisant des molécules d'intérêt pharmaceutique à forte valeur ajoutée ne pouvant être produites en synthèse organique. Il est tout à fait possible que la production de flavonoïdes puisse être stimulée *via* l'expression constitutive de la C3'H ou d'une autre enzyme. Les études qui sont menées actuellement au laboratoire ont permis de mettre en évidence une flavonoïde hydroxylase d'*A. majus*. Une des possibilités qui nous est ouverte consisterait à surproduire cette enzyme chez *R. graveolens* et effectuer un profilage métabolique afin d'évaluer les modifications qui pourraient survenir.

A l'inverse, le génie métabolique pourrait être utilisé pour diminuer voire annihiler la production de furocoumarines. Il est avéré que les furocoumarines ont un effet inhibiteur de cytochromes P450. Or chez l'animal, les P450 hépatiques sont, entre autres, à la base des systèmes de détoxifications. C'est ainsi que les furocoumarines peuvent potentialiser les effets d'autres xénobiotiques, notamment lorsqu'il s'agit de médicaments associés à une consommation d'aliments contenant des furocoumarines (ex : jus de pomelo). Ainsi, une inhibition de certains P450 hépatiques et intestinaux (surtout CYP3A4) peut entraîner une accumulation des substances médicamenteuses circulantes et donc s'avérer dangereuse (Chan *et al.* 1998 ; Ho *et al.* 2001). A titre d'exemple, des modifications pharmacocinétiques (augmentation de la biodisponibilité orale) ont été rapportées lors de l'ingestion de jus de pomelo avec de nombreux médicaments (ciclosporine, vérapamil, carbamazépine, buspirone, cisapride) (données personnelles du Centre Antipoison et de toxicovigilance de Nancy). Lorsque le grand public sera prêt à consommer des aliments issus de l'agriculture transgénique, il sera donc possible de diminuer par génie métabolique la production de furocoumarines chez des plantes agronomiques telle le pomelo. Cette mesure aurait donc pour conséquence une diminution mondiale du nombre de cas d'intoxications liées à la prise concomitante de médicaments et de jus de pomelo.

Le métabolisme secondaire reste une source de molécules d'intérêt pharmaceutique sans équivalent. L'ingénierie métabolique nous permettra dans un futur proche, d'exploiter encore mieux ces ressources.

Annexes :

1 Composition du milieu MS

Macroéléments	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	440
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Vitamines	mg/l
Inositol	100
Ac nicotinique	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1
Glycine	2
Microéléments	mg/l
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ , H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,025
Fer	mg/l
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA, 2 H ₂ O	37,8
pH	5,8

2 GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)

- 1. Culture cellulaire.** Culotter 1-5 mL d'une culture d'*E. coli* qui a poussé la nuit par centrifugation pendant 1 minute à plus de 12000 g. Le volume optimal de la culture à utiliser dépend du plasmide et de la densité cellulaire. Pour de meilleurs résultats avec des *E. coli* transformées poussant dans du LB, utiliser 1-3 mL de culture pour les plasmides à fortes copies ou 1-5 mL de culture pour les plasmides à faibles copies.
- 2. Resuspension des cellules.** Lors de la première utilisation, être sûr d'ajouter le volume approprié de solution de RNase A à la solution de resuspension. Resuspendre complètement le culot de bactéries avec 200 µL de solution de resuspension en vortexant ou en pipetant.
- 3. Lyse cellulaire.** Lysér les cellules resuspendues par ajout de 200 µL de solution de lyse. Immédiatement, inverser le contenu par inversion (6 à 8 fois) jusqu'à ce que la mixture devienne claire et visqueuse. Ne pas vortexer. Un mélange brutal pourrait causer des cassures de l'ADN génomique, qui provoquerait une contamination de l'ADN plasmidique par de l'ADN génomique. La réaction de lyse ne doit pas excéder 5 minutes. Une lyse alcaline prolongée pourrait de manière permanente dénaturer la super hélice de l'ADN plasmidique, ce qui la rendrait inutilisable pour beaucoup d'autres applications en aval.
- 4. Neutralisation.** Précipiter les débris cellulaires en additionnant 350 µL de solution de neutralisation/fixation. Mélanger les tubes par inversion, 4 à 6 fois. Culotter les débris cellulaire par centrifugation de plus de 12000 g pendant 10 minutes. Si le surnageant contient une grande quantité de particules en suspension après centrifugation, recentrifuger avant de procéder à l'étape 6.
- 5. Préparation de la colonne.** Insérer une GenElute™ Miniprep Binding Column dans un tube à centrifuger. Additionner 500 µL de solution de préparation de la colonne dans chacune d'elles, et centrifuger à 12000 g pendant 1 minute. Enlever le liquide.

- 6. Chargement du lysat nettoyé.** Transférer le lysat éclairci de l'étape 4 à la colonne préparée dans l'étape 5, et centrifuger à plus de 12000 g pendant 1 minute.
- 7. Lavage de la colonne.** Lors de la première utilisation, s'assurer d'ajouter l'éthanol à la solution de lavage concentré. Additionner 750 µL de solution de lavage dilué à la colonne. Centrifuger à plus de 12000 g pendant 1 minute. L'étape de nettoyage de la colonne enlève les sels résiduels et les autres contaminants introduits précédemment. Enlever le liquide et centrifuger à nouveau à vitesse maximum pendant 2 minutes sans additionner de solution de lavage pour enlever l'excès d'éthanol.
- 8. Elution de l'ADN.** Transférer la colonne dans un nouveau tube. Additionner 50 µL d'eau ultrapure purifiée ou 5 mM Tris-HCl, pH 8.0. Centrifuger à plus de 12000 g pendant 1 minute. Recommencer l'opération avec à nouveau 50 µL de solution. L'ADN est maintenant présent dans l'éluât, et est prêt pour une utilisation immédiate ou peut être stocké à -20°C.

3 QIAEX II : extraction d'ADN d'un gel d'agarose

1. Exciser la bande d'ADN du gel d'agarose avec une lame ou un scalpel.

Minimiser la taille de la bande de gel en enlevant l'excès d'agarose. Utiliser un tube de centrifugation de 1,5 mL pour traiter 250 mg d'agarose.

2. Déposer le morceau de gel dans un tube. additionner 3 volumes de tampon QX1 pour 1 volume de gel pour un fragment d'ADN allant de 100 pb à 4 kb ; autrement, se référer à la table suivante.

Fragments d'ADN < 100 pb	additionner 6 volumes de tampon QX1
Fragments d'ADN > 4 kb	additionner 3 volumes de tampon QX1 plus 2 volumes d'eau
gels d'agarose > 2%	additionner 6 volumes de tampon QX1

3. Resuspendre QIAEX II en vortexant pendant 30 secondes. Additionner QIAEX II à l'échantillon en suivant la table et mixer.

$\leq 2 \mu\text{g}$ d'ADN	additionner 10 μl de QIAEX II
2-10 μg d'ADN	additionner 30 μl de QIAEX II
chaque 10 μg d'ADN en plus	additionner 30 μl de QIAEX II

4. Incuber à 50°C pendant 10 minutes pour solubiliser l'agarose et libérer l'ADN. mélanger en vortexant* toutes les deux minutes pour maintenir QIAEX II en suspension. Faire attention que la couleur de la mixture reste jaune.

Si la couleur du mélange est orange ou pourpre, additionner 10 μL d'acétate de sodium 3 M, pH 5.0 et mélanger. La couleur doit redevenir jaune. L'incubation doit alors se poursuivre en additionnant au moins 5 minutes.

L'adsorption de l'ADN aux particules de QIAEX II est seulement efficace à $\text{pH} \leq 7.5$. Le tampon QX1 contient un indicateur de pH qui est jaune à $\text{pH} \leq 7.5$, et orange ou violet à pH supérieur, permettant une détermination facile du pH optimal pour fixer l'ADN.

5. Centrifuger l'échantillon pendant 30 secondes et enlever minutieusement le surnageant avec une pipette.

6. Laver le culot avec 500 µL de tampon QX1.

Resuspendre le culot en vortexant*. Centrifuger l'échantillon pendant 30 secondes et enlever toute trace de surnageant avec une pipette. Cette étape de lavage enlève les résidus d'agarose contaminants.

7. Laver deux fois le culot avec 500 µL de tampon PE.

Resuspendre le culot en vortexant*. Centrifuger l'échantillon pendant 30 secondes et enlever délicatement toute trace de surnageant avec une pipette. Ces étapes de lavage enlèvent les résidus de sel contaminant.

8. Laisser sécher le culot pendant 10 à 15 minutes ou jusqu'à ce que le culot devienne blanc.

Si 30 µL de suspension de QIAEX II est utilisé, laisser sécher le culot approximativement 30 minutes. Ne pas faire le vide, car ça pourrait causer un sur séchage. Un sur séchage du culot de QIAEX II pourrait résulter en une diminution de l'efficacité d'élution.

9. Pour éluer l'ADN, additionner 20 µL de 10 mM tris-HCl, pH 8.5 ou de l'eau ultrapure, et resuspendre le culot en vortexant*. Incuber en fonction de la table jointe.

Fragments d'ADN ≤ 4 kb	incuber à température ambiante pendant 5 minutes
Fragments d'ADN 4-10 kb	incuber à 50°C pendant 5 minutes
Fragments d'ADN ≥ 10 kb	incuber à 50°C pendant 10 minutes

L'efficacité d'élution dépend du pH. L'efficacité maximale d'élution est obtenue entre pH 7.0 et 8.5. Quand de l'eau est utilisée pour l'élution, vérifier que le pH est dans cette zone, et stocker l'ADN à -20°C car l'ADN peut être dégradé en absence d'agent tampon. L'ADN purifié peut aussi être élué dans du tampon TE (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), mais l'EDTA pourrait inhiber des réactions enzymatiques ultérieures.

** pour les fragments plus grands que 10kb, resuspendre le culot par inversion et en secouant le tube. Vortexer peut causer des cassures des larges fragments d'ADN.*

Références bibliographiques

- Abdulrazzak, N., Brigitte Pollet, Jurgen Ehling, Kim Larsen, Carole Asnaghi, Sebastien Ronseau, Caroline Proux, Mathieu Erhardt, Virginie Seltzer, Jean-Pierre Renou, Pascaline Ullmann, Markus Pauly, Catherine Lapiere and a. D. Werck-Reichhart (2006). "A coumaroyl-ester-3-hydroxylase Insertion Mutant Reveals the Existence of Nonredundant meta-Hydroxylation Pathways and Essential Roles for Phenolic Precursors in Cell Expansion and Plant Growth." Plant Physiology **140**: 30-48.
- Akashi, T., Fukuchi-Mizutani M., Aoki T., Ueyama Y., Yonekura-Sakakibara K., Tanaka Y., Kusumi T. and Ayabe S. (1999). "Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cytochrome P450, flavone synthase II, that catalyzes direct conversion of flavanones to flavones." Plant Cell Physiol. **11**: 1182-6.
- Allwood, E. G., Davies D.R., Gerrish C., Ellis B.E. and Bolwell G.P. (1999). "Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue." FEBS Letters **457**: 47-52.
- Arencibia, A., Molina P., de la Riva G. and Selmán-Housein G. (1995). "Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation." Plant Cell Reports **14**: 305-309.
- Bak, S., Kahn R.A., Nielsen H.L., Møller B.L. and Halkier B.A. (1998). "Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin." Plant Molecular Biology **36**(3): 393-405.
- Baskin, J. M., Ludlow C.J., Harris T.M. and Wolf F.T. (1967). "Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subcaulis* (Leguminosae)." Phytochemistry **6**: 1209-1213.
- Basson, A. E. and I. A. Dubery (2007). "Identification of a cytochrome P450 cDNA (CYP98A5) from *Phaseolus vulgaris*, inducible by 3,5-dichlorosalicylic acid and 2,6-dichloro isonicotinic acid." Journal of Plant Physiology **164**(4): 421-428.
- Batard, Y., Schalk M., Pierrel M.A., Zimmerlin A., Durst F. and Werck-Reichhart D. (1997). "Regulation of the cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A1) in Jerusalem artichoke tubers in response to wounding and chemical treatments." Plant Physiology **113**(951-959).
- Beijersbergen van Henegouwen, G. M., Wijn E.T., Schoonderwoerd S.A. and Dall'Acqua F. (1989). "A method for the determination of PUVA-induced in vivo irreversible binding of 8-methoxypsoralen (8-MOP) to epidermal lipids, proteins and DNA/RNA." J. Photochem Photobiol B. **3**: 631-635.
- Bell-Lelong, D., Cusumano J C, Meyer K and Chapple C (1997a). "Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. Regulation in response to development and the environment." Plant Physiology **113**(3): 729-738.
- Bell-Lelong, D. A., J. C. Cusumano, K. Meyer and C. Chapple (1997b). "Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. Regulation in response to development and the environment." Plant Physiology **113**(3): 729-738.
- Bellés, J. M., López-Gresa María Pilar, Fayos Joaquín, Pallás Vicente, Rodrigo Ismael and Conejero Vicente (2008). "Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants." Plant Science **174**(5): 524-533.

- Bensasson, R. V., Land E.J. and Salet C. (1978). "Triplet excited of furocoumarins : reaction with nucleic acid bases and amini acids. " Photochem Photobiol. **27**(3): 273-280.
- Benveniste, I., Saito T., Wang Y., Kandel S., Huang H., Pinot F., Kahn R., Salaun J-P. and Shimoji M. (2006). "Evolutionary relationship and substrate specificity of Arabidopsis thaliana fatty acid omega-hydroxylase." Plant Science **170**(2): 326-338.
- Berenbaum, M. and P. Feeny (1981). "Toxicity of Angular Furanocoumarins to Swallowtail Butterflies: Escalation in a Coevolutionary Arms Race?" **212**(4497): 927-929.
- Betz, C., T. G. McCollum and R. T. Mayer (2001). "Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in 'Valencia' orange (Citrus sinensis Osbeck)." Plant Molecular Biology **46**(6): 741-748.
- Birch, R. G. (1997). "Plant transformation : problems and strategies for practical application." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**: 297-326.
- Bohlmann, J., Lins T., Martin W. and Eilert U. (1996). "Anthranilate synthase from *Ruta graveolens*. Duplicated AS alpha genes encode tryptophan-sensitive and tryptophan-insensitive isoenzymes specific to amino acid and alkaloid biosynthesis." Plant Physiology **111**(2): 507-514.
- Bolwell, G. P., Bozak Kristin and Zimmerlin Alfred (1994). "Plant cytochrome p450." Phytochemistry **37**(6): 1491-1506.
- Boudet, A.-M. (2007). "Evolution and current status of research in phenolic compounds." Phytochemistry **68**(22-24): 2722-2735.
- Boudet, A. M. (2000). "Lignins and lignification: Selected issues." Plant Physiology and Biochemistry **38**(1): 81-96.
- Bourgaud, F., Allard N., Guckert A. and Forlot P. (1989). Natural sources of furocoumarins (psoralens). Psoralens: Past, Present and Future of Photochemoprotection and other biological activities. T. B. Fitzpatrick, Forlot, P., Pathak, M.A., Urbach, F. Paris, John Libbey Eurotext: Psoralens: Past, Present and Future of Photochemoprotection and other biological activities.
- Bourgaud, F., A. Hehn, Lariat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S and Matern U (2006). "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes." Phytochemistry Reviews **5** : 293-308.
- Brendel, M., Bonatto D., Strauss M., Revers L.F., Pungartnik C., Saffi J. and Henriques J.A.P. (2003). "Role of PSO genes in repair of DNA damage of Saccharomyces cerevisiae." Mutation Research/Reviews in Mutation Research **544**(2-3): 179-193.
- Brown, S. A. (1970). "Biosynthesis of furanocoumarins in parnsips." Phytochemistry **9**: 2471-2475.
- Brown, S. A. and A. M. Zobel (1990). "Biosynthesis and distribution of coumarines in the plant. Atti del convegno Cumarine : ricerca ed applicazione, Padova."
- Cabello-Hurtado, F., Batard Y., Salaun J.P., Durst F., Pinot F. and Werck-Reichhart D. (1998). "Cloning, expression in yeast, and functional characterization of CYP81B1, a plant cytochrome P450 that catalyzes in-chain hydroxylation of fatty acids." The Journal Of Biological Chemistry **273**(13): 7260-7267.
- Caffieri, S., Scoonderwoerd S.A., Daga A., Dall'Acqua F. and Beijersbergen van Henegouwen G.M.J. (1989). "Photoaddition of 4,6,4'-triméthyl-angelicin to unsaturated fatty acids: possible in vivo occurrence." Med. Biol. Environ. **44**: 796-804.
- Cangelosi, G. A., Martinetti G., Leigh J.A., Lee C.C., Theines C. and Nester E.W. (1989). "Role of Agrobacterium tumefaciens chvA protein in export of beta-1,2 glucan." Journal Of Bacteriology **171**: 1609-1615.

- Caporale, G., Innocenti Gabbriella, Guiotto Adriano, Rodighiero Paolo and Dall'Acqua Francesco (1981). "Biogenesis of linear O-alkylfuranocoumarins: A new pathway involving 5-hydroxymarmesin." Phytochemistry **20**(6): 1283-1287.
- Chadhary, S. K., Ceska O., Warrington P.J. and Ashwood-Smith M.J. (1985). "Increased furocoumarin content of celery during storage." J. Agr. Food. Chem. **33**(6): 1153-1157.
- Chan, W. K., V. P. Nguyen and R. Z. Harris (1998). "Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 3A4 by grapefruit juice and red wine." Life Sciences **62**(10): 135-142.
- Chen, H., H. Jiang and J. A. Morgan (2007). "Non-natural cinnamic acid derivatives as substrates of cinnamate 4-hydroxylase." Phytochemistry **68**(3): 306-311.
- Chen, J.-Y., P.-F. Wen, W.-F. Kong, Q.-H. Pan, S.-B. Wan and W.-D. Huang (2006). "Changes and subcellular localizations of the enzymes involved in phenylpropanoid metabolism during grape berry development." Journal of Plant Physiology **163**(2): 115-127.
- Chen, L., Li C.M. and Nester E.W. (2000). "Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of virB." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **97**(13): 7545-7550.
- Chiba, M., Nishime J. and Lin J.H. (1995). "Potent and selective inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 isoforms by L-754,394, an investigational human immune deficiency virus protease inhibitor." J Pharmacol Exp Ther **275**(3): 1527-1534.
- Citovsky, V., Guralnik B., Simon M.N. and Wall J.S. (1987). "The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single DNA complexes involved in nuclear import." J. Mol. Biol. **272**: 718-727.
- Coleman, H., Park Ji-Young, Nair Ramesh, Chapple Clint and Mansfield Shawn D. (2008). "RNAi-mediated suppression of p-coumaroyl-CoA 3'-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism." Plant Biology **105**(11): 4501-4506.
- Collu, G., Unver N., Peltenburg-Looman A.M.G., van der Heijden R., Verpoorte R. and Memelink J. (2001). "Geraniol 10-hydroxylase, a cytochrome P450 enzyme involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis." FEBS Letters **508**(2): 215-220.
- Coruzzi, G. and R. Last (2000). Amino acids. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jones. Rockville, USA, American Society of Plant Physiologists: 358-410.
- Crossway, A., Oakes J.V., Irvine J.M., Ward B., Knauf V.C. and Sholmaker C.K. (1986). "Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts." Molecular & General Genetics: MGG **202**: 179-185.
- Czichi, U. and H. Kindl (1975). "Formation of *p*-coumaric acid and o-coumaric acid from L-phenylalanine by microsomal membrane fractions from potato: evidence for membrane-bound complexes." Planta **125**: 115-125.
- Dafny-Yelin, M., Levy Avner and Tzfira Tzvi (2008). "The ongoing saga of *Agrobacterium*-host interactions." Trends in Plant Science **13**(3): 102-105.
- Daiber, A., Shoun H. and Volker U. (2005). "Nitric oxide reductase (P450nor) from *Fusarium oxysporum*." Journal of Inorganic Biochemistry **99**(1): 185-193.
- Dall'Acqua, F. and P. Martelli (1991). "Photosensitising action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events." J. Photochem Photobiol: 235-254.

- Dardalhon, M., de Massy B., Nicolas A. and Averbek D. (1998). "Mitotic recombination and localized DNA double strand breaks are induced after 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in *Saccharomyces cerevisiae*." Current Genetics **34**: 30-42.
- De Block, M. and D. Debrouwer (1991). "Two T-DNA's co-transformed into *brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus." Theoretical and Applied Genetics **82**: 257-263.
- De La Riva, G., Gonzalez-Cabrera Joel, Vazquez-Padron Roberto and Ayra-Pardo Camilo (1998). "Agrobacterium tumefaciens : a natural tool for plant transformation." Electronic journal of Biotechnology **1**(3): 1-16.
- Degtyarenko, K. N. and A. I. Archakov (1993). "Molecular evolution of P450 superfamily and monooxygenase systems." FEBS **332**(1,2): 1-8.
- Deidra, B., Brandie Fullmer, Saif Syed, Gregory Seltzer, Joseph Tiano, Carrie Rischko, Linda Gillespie, Douglas Brown and Francis P. Gasparro (1999). "Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine." Journal of Dermatological Science **19**(2): 78-88.
- Derks, W., Trumble J. and Winter C. (1990). "Impact of atmospheric pollution on linear furanocoumarin content in celery." J. Chem.Ecol. **16**(2): 443-454.
- Didierjean, L., Perkins R., Lau S.-M.C., Schaller H., O'Keefe D.P. and Werck-Reichhart D. (2002). "Engineering herbicide metabolism in tobacco and Arabidopsis with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from Jerusalem artichoke." Plant Physiology **130**(1): 179-189.
- Dixon, R. A. and N. L. Paiva (1995). "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism." The Plant Cell **7**: 1085-1097.
- Dixon, R. A. and C. L. Steele (1999). "Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering." Trends in Plant Science **4**(10): 394-400.
- Edelson, R. (1988). "Les médicaments photoactivés." Pour la Science **132**: 64-72.
- Ellis, B. E. and S. A. Brown (1974). "Isolation of dimethylallylpyrophosphatase: Umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*." Canadian Journal of Biochemistry **52**(9): 734-738.
- Endler, A., S. Martens, F. Wellmann and U. Matern (2008). "Unusually divergent 4-coumarate : CoA-ligases from *Ruta graveolens* L." Plant Mol Biol **67**: 335-346.
- Enriquez-Obregon, G. A., Vazquez-Padron R.I., Prietosansonov D.L., de la Riva G.A. and Selman-Houssein G. (1998). "Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation." Planta **206**: 20-27.
- Enriquez-Obregon, G. A., Vazquez-Padron R.I., Prietosansonov D.L., Pérez M. and Selman-Houssein G. (1997). "Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds." Biotechnologia Applicada **14**: 169-174.
- Feldmann, K. A. and M. D. Marks (1987). "*Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* : a non-tissue culture approach." Molecular & General Genetics: MGG **208**: 1-9.
- Felgner, L. and G. M. Lingold (1989). "Cationic liposome mediated transfection." Nature **337**: 387-388.
- Fouin-Fortunet, H., Tinel M., Descatoire V., Letteron P., Larrey D., Geneve J. and Pessayre D. (1986). "Inactivation of cytochrome P-450 by the drug methoxsalen." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **236**(1): 237-247.

- Franke, R., M. R. Hemm, J. W. Denault, M. O. Ruegger, J. M. Humphreys and C. Chapple (2002a). "Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis." The Plant Journal **30**(1): 47-59.
- Franke, R., J. M. Humphreys, M. R. Hemm, J. W. Denault, M. O. Ruegger, J. C. Cusumano and C. Chapple (2002b). "The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism." The Plant Journal **30**(1): 33-45.
- Frick, S., Kramell R. and Kutchan T.M. (2007). "Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding." Metabolic Engineering **9**(2): 169-176.
- Frick, S. and R. K. a. T. M. Kutchan (2006). "Metabolic engineering with a morphine biosynthetic P450 in opium poppy surpasses breeding." Metabolic Engineering.
- Fromm, M., Taylor L.P. and Walbot V. (1985). "Expression of genes transferred into monocotyledonous plant cells by electroporation." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **82**: 5824-5828.
- Fromm, M., Taylor L.P. and Walbot V. (1986). "Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation." Nature **319**: 791-793.
- Fuhr, U. (1998). "Drug interactions with grapefruit juice. Extent, probable mechanism and clinical relevance." Drug Safety : an international Journal of Medical Toxicology and Drug Experience **18**: 251-272.
- Gang, D. R., Beuerle Till, Ullmann Pascaline, Werck-Reichhart Danièle and Pichersky Eran (2002). "Differential Production of meta Hydroxylated Phenylpropanoids in Sweet Basil Peltate Glandular Trichomes and Leaves Is Controlled by the Activities of Specific Acyltransferases and Hydroxylases." Plant Physiology **Vol. 130**: pp. 1536–1544.
- Gestetner, B. and E. E. Conn (1974). " The 2-hydroxylation of trans-cinnamic acidby chloroplasts from Melilotus alba Desr." Archives of Biochemistry and Biophysics **163**: 617-624.
- Goujon, T., R. Sibout, A. Eudes, J. MacKay and L. Jouanin (2003). "Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in Arabidopsis thaliana." Plant Physiology and Biochemistry **41**(8): 677-687.
- Gravot, A., Larbat R., Hehn A., Lievre K., Gontier E., Goergen J.L. and Bourgaud F. (2004). "Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant--Ruta graveolens--exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation." Archives of Biochemistry and Biophysics **422**(1): 71-80.
- Grechkin, A. N., Bruhlmann F., Mukhtarova L.S., Gogolev Y.V. and Hamberg M. (2006). "Hydroperoxide lyases (CYP74C and CYP74B) catalyze the homolytic isomerization of fatty acid hydroperoxides into hemiacetals." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1761**(12): 1419-1428.
- Gritz, L. and J. Davies (1983). "Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae." Gene **25**(2-3): 179-188.
- Hahlbrock, K. and G. Schröder (1975). "Light-induced changes in enzyme activities in parsley cell suspension cultures. increased rate of synthesis of phenylalanine ammonia-lyase." Archives of Biochemistry and Biophysics **166**: 47-53.
- Haldrup, A., Petersen S.G. and Okkels F.T. (1998a). "Positive selection:a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry." Plant Cell Reports **18**: 76-81.

- Haldrup, A., Petersen S.G. and Okkels F.T. (1998b). "The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent." Plant Molecular Biology **37**: 287-296.
- Hale, A. L., Meepagala K.M., Oliva A., Aliotta G. and Duke S.O. (2004). "Phytotoxins from the Leaves of *Ruta graveolens*." J. Agric. Food Chem. **52**(11): 3345-3349.
- Hamerski, D. and U. Matern (1988). "Biosynthesis of psoralens Psoralen 5-monooxygenase activity from elicitor-treated *Ammi majus* cells." FEBS Letters **239**(2): 263-265.
- Hamilton, C. M., Frary Anne, Lewis Candice and Tanksley Steven D. (1996). "Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 9975-9979.
- Hansen, G. and M.-D. Chilton (1996). "'Agrolistic' transformation of plant cells: Integration of T-strands generated in planta." Plant Biology **93**: 14978-14983.
- Hansen, G., Shillito Raymond D. and Chilton Mary-Dell (1997). "T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**: 11726-11730.
- Hasemann, C. A., Kurumbail R. G., Boddupalli S. S., J. A. Peterson and Deisenhofer J. (1995). "Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures." Structure **3**(1): 41-62.
- Haufler, K. D., Hahlbrock K. and Scheel D. (1986). "Elicitor-stimulated furanocoumarin biosynthesis in cultured parsley cells: S-adenosyl-L-methionine: xanthotoxin O-methyltransferases." Zeitschrift für Naturforschung **41**(c): 228-239.
- Hermann, M., Luka Richard, Ekiert Halina and Matern Ulrich (2004). "Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L." European Journal of Biochemistry **Volume 271** (Issue 5): Page 932.
- Hehn, A. (2007). Métabolisme secondaire : Les Cytochromes P450s acteurs de l'adaptation des plantes à leur environnement. Laboratoire Agronomie et Environnement. Nancy, INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE ET DES INDUSTRIES LAITIÈRES: 86.
- Heller, W. and T. Kühnl (1985). "Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl)shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures." Archives of Biochemistry and Biophysics **241**: 453-460.
- Henseler, T., Wolff K., Honigsmann H. and Christophers E. (1981). "Oral 8-methoxypsoralen photochemotherapy of psoriasis. The Europea PUVA study : a cooperative study among 18 European centres." Lancet. **1**: 853-857.
- Herrera-Estrella, L., Depicker Ann, Van Montagu Marc and Schell Jeff (1983). "Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector." 303(5914): 209-213.
- Ho, P. C., D. J. Saville and S. Wanwimolruk (2001). "Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds." Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **4**(3): 217-227.
- Holm, P. B., Olsen Ole, Schnorf Martin, Brinch-Pedersen Henrik and Knudsen Søren (2000). "Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts." Transgenic Research **9**(1): 21-32.
- Hooykaas, P. J. J., Klapwijk P.M., Nuti M.P., Schilperoort R.A. and Rörsch A. (1977). "Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent *agrobacteria* and to *Rhizobium ex planta*." Journal Of General Microbiology **98**: 477-484.

- Hooykaas, P. J. J. and R. A. Schilperoort (1992). "Agrobacterium and plant genetic engineering." Plant Molecular Biology **19**: 15-38.
- Hubner, S., M. Hehmann, S. Schreiner, S. Martens, R. Lukacin and U. Matern (2003). "Functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from *Ammi majus* L." Phytochemistry **64**(2): 445-452.
- Hughes, R. K., Belfield E., Ashton R., Fairhurst S. A., Gobel C., Stumpe M., Feussner I. and Casey R. (2006). "Allene oxide synthase from *Arabidopsis thaliana* (CYP74A1) exhibits dual specificity that is regulated by monomer-micelle association." FEBS Letters **580**(17): 4188-4194.
- Humphreys, J. M. and C. Chapple (2002). "Rewriting the lignin roadmap." Current Opinion in Plant Biology **5**(3): 224-229.
- Humphreys, J. M., Hemm M.R. and Chapple C. (1999). "New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependant monooxygenase." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **96**: 10045-10050.
- Innocenti, G., Dall'Acqua F., Guiotto A., Rodighiero P. and Caporale G. (1981). "The role of hydroxymarmesins in the biogenesis of O-alkylfurocoumarins." Il Farmaco Edizione scientifica **36**(7): 614-621.
- Innocenti, G., Dall'Acqua Francesco and Caporale Giuseppe (1983). "The role of 5,8-dihydroxypsoralen in the biosynthesis of isopimpinellin." Phytochemistry **22**(10): 2207-2209.
- Jackson, R. G., Rylott E.L., Fournier D., Hawari J. and Bruce N.C. (2007). "Exploring the biochemical properties and remediation applications of the unusual explosive-degrading P450 system XplA/B." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(43): 16822-16827.
- Janssen, B. J. and R. C. Gardner (1989). "Localised transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*." Plant Molecular Biology **14**: 61-72.
- Jennewein, S., Long Robert M., Williams Robert M. and Croteau Rodney (2004). "Cytochrome P450 Taxadiene 5[alpha]-Hydroxylase, a Mechanistically Unusual Monooxygenase Catalyzing the First Oxygenation Step of Taxol Biosynthesis." Chemistry & Biology **11**(3): 379-387.
- Jin, H., Cominelli E., Bailey P., Parr A., Mehrtens F., Jones J., Tonelli C., Weisshaar B. and Martin C. (2000). "Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*." The EMBO Journal **19**(22): 6150-6161.
- Joersbo, M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen Klaus, Brunstedt J. and Okkels F.T. (1998). "Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet." Molecular Breeding **4**: 111-117.
- Johnson, T. M. and A. Das (1998). Organization and regulation of expression of the ***Agrobacterium*** virulence genes. The Rhizobiaceae : molecular biology of model plant-associated bacteria. H. P. Spaik, A. Kondorosi and P. J. J. Hooykaas, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 265-279.
- Jørgensen, K., Anne Vinther Rasmussen, Marc Morant, Allan Holm Nielsen, Nanna Bjarnholt, Mika Zagrobelyny, S. Bak and a. B. L. Møller (2005). "Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products." Current Opinion in Plant Biology **8**(3): 280-291.
- Kai, K., Masaharu Mizutani, Naohiro Kawamura, Ryotaro Yamamoto, Michiko Tamai, Hikaru Yamaguchi, Kanzo Sakata and Bun-ichi Shimizu (2008). "Scopoletin is biosynthesized

- via ortho-hydroxylation of feruloyl CoA by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase in *Arabidopsis thaliana*." The Plant Journal.
- Kai, K., B.-i. Shimizu, M. Mizutani, K. Watanabe and K. Sakata (2006). "Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*." Phytochemistry **67**: 379-386.
- Kandel, S., Sauveplane V., Compagnon V., Franke R., Millet Y., Schreiber L., Werck-Reichhart D. and Pinot F. (2007). "Characterization of a methyl jasmonate and wounding-responsive cytochrome P450 of *Arabidopsis thaliana* catalyzing dicarboxylic fatty acid formation in vitro." European J. Biochem. **274**(19): 5116-5127.
- Kaspera, R. and Croteau R. (2006). "Cytochrome P450 oxygenases of Taxol biosynthesis." Phytochem Rev.
- Kawase, M., H. Sakagami, N. Motohashi, Hauer H, Chatterjee SS and Spengler G (2005). "Coumarin derivatives with tumor-specific cytotoxicity and multidrug resistance reversal activity. ." In Vivo **19**: 705-711.
- Kemper, B. (2004). "Structural basis for the role in protein folding of conserved proline-rich regions in cytochromes P450." Toxicology and Applied Pharmacology **199**(3): 305-315.
- Kindl, H. (1971). "Zur Frage der **ortho**-Hydroxylierung aromatischer Carbonsäuren in höheren Pflanzen." Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem **352**: 78-84.
- Kirsten, N., T. Annette, J. P. David B., M. Raymond and Birger Lindberg (2008). "Metabolon formation in dhurrin biosynthesis." Phytochemistry **69**(1): 88-98.
- Klapwijk, P. M., Scheulderman T. and Schilperoort R.A. (1978). "Coordinated regulation of octopine degradation and conjugative transfer of Ti plasmids in ***Agrobacterium tumefaciens*** : evidence for a common regulatory gene and separate operons." Journal Of Bacteriology **136**: 775-785.
- Klein, T. M., Wolf E.D., Wu R. and Sanford J.C. (1987). "High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells." Nature **327**: 70-73.
- Klingenberg, M. (1958). "Pigments of rat microsomes." Arch Biochem Biophys **75**: 376-378.
- Koenigs, L. L. and W. F. Trager (1998). "Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 8-methoxypsoralen and several other furocoumarins." Biochemistry **37**(38): 13184-13193.
- Koopmann, E., Logemann E. and Hahlbrock K. (1999). "Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from Parsley." Plant Physiology **119**(1): 49-55.
- Kristensen, C., Morant M., Olsen C.E., Ekstrøm C.T., Galbraith D.W., B. L. Møller and Bak S. (2005). "Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(5): 1779-1784.
- Kühnl, T., Koch Ulrich, Heller Werner and Eckard Wellmann (1987). "Chlorogenic acid biosynthesis: Characterization of a light-induced microsomal 5-O-(4-coumaroyl)-quinic/shikimate 3'-hydroxylase from carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures." Archives of Biochemistry and Biophysics **258**(1): 226-232.
- Lai, E.-M. and C. Kado (2000). "The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*." Trends in Microbiology **8**(8): 361-369.
- Lai, E.-M. and C. Kado (2002). "The *Agrobacterium tumefaciens* T pilus composed of cyclic T pilin is highly resilient to extreme environments." FEMS Microbiology Letters **210**(1): 111-114.

- Larbat, R., Kellner S., Specker S., Hehn A., Gontier E., Hans J., Bourgaud F. and Matern U. (2007). "Molecular Cloning and Functional Characterization of Psoralen Synthase, the First Committed Monooxygenase of Furanocoumarin Biosynthesis." JBC **282**(1): 542-554.
- Latunde-Dada, A. O., Cabello-Hurtado F., Czittrich N., Didierjean L., Schopfer C., Hertkorn N., Werck-Reichhart D. and Ebel J. (2001). "Flavonoid 6-Hydroxylase from Soybean (*Glycine max* L.), a Novel Plant P-450 Monooxygenase." J. Biol. Chem. **276**(3): 1688-1695.
- Lee, D.-S., P. Nioche, M. Hamberg and C. S. Raman (2008). "Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes." Nature.
- Li, R., Reed D.W., Liu E., Nowak J., Pelcher L.E., J. E. Page and P. S. Covello (2006). "Functional Genomic Analysis of Alkaloid Biosynthesis in *Hyoscyamus niger* Reveals a Cytochrome P450 Involved in Littorine Rearrangement." Chemistry & Biology **13**(5): 513-520.
- Lièvre, K., Hehn Alain, Tran Thi Le Minh, Gravot Antoine, Thomasset Brigitte, Bourgaud Frederic and Gontier Eric (2005). "Genetic transformation of the medicinal plant *Ruta graveolens* L. by an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method." Plant Science **168**(4): 883-888.
- Lucca, P., Ye Xudong and Potrykus Ingo (2001). "Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent." Molecular Breeding **7**: 43-49.
- Mahesh, V., Million-Rousseau Rachel, Ullmann Pascaline, Chabrilange Nathalie, Bustamante José, Mondolot Laurence, Morant Marc, Noirot Michel, Hamon Serge, de Kochko Alexandre, Werck-Reichhart Danièle and Campa Claudine (2007). "Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree : evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis." Plant Molecular Biology **64**(1-2): 145-159.
- Maliga, P. (2002). "Engineering the plastid genome of higher plants." Current Opinion in Plant Biology **5**(2): 164-172.
- Mansuy, D. (1998). "The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **121**(1-3): 5-14.
- Marley, K. A., Larson R.A. and Davenport R. (1995). "Alternative mechanism of psoralen phototoxicity." Light activated pest control. a. c. society: 179-188.
- Marton, L. (1994). "T-DNA-insert-independent mutations induced in transformed plant cells during *Agrobacterium* co-cultivation." Transgenic Research **3**: 317-325.
- Massot, B. (2001a). Etude de la production de furanocoumarines linéaires par des cultures *in vitro* de *Ruta graveolens* L. Laboratoire Agronomie et Environnement ENSAIA-INRA. Vandoeuvre-lès-Nancy, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Massot, B. (2001b). Etude de la production de furocoumarines linéaires par des cultures *in vitro* de *Ruta graveolens* L. Laboratoire Agronomie Environnement. Nancy, INPL-ENSAIA: 160.
- Massot, B., Milesi S., Gontier E., Bourgaud F. and Guckert A. (2000). "Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **62**: 11-19.
- Matern U., Strasser H., Wendorff H. and Hamerski D. (1988). "Coumarins and furanocoumarins." Cell culture and somatic cell genetics of plants, Academic Press: 3-20.

- Matthysse, A. G. (1983). "Role of the bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells." Journal Of Bacteriology **154**: 906-915.
- Matthysse, A. G. (1987). "Characterization of nonattachnig mutants of *Agrobacterium tumefaciens*." Journal Of Bacteriology **169**: 313-323.
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Bakkeren A., Crameri A., Angelis K., Redei G.P., Schell J., Hohn B. and Koncz C. (1991). "T-DNA integration : a model of illegitimate recombination in plants." EMBO Journal **10**: 697-704.
- McCloud, E. S., Berenbaum M.R. and Tuveson R.W. (1992). "Furanocoumarin content and phototoxicity of rough lemon (*Citrus jambhiri*) foliage exposed to enhanced ultraviolet-B (UVB) irradiation." Journal of Chemical Ecology **18**(7): 1125-1137.
- Melet, A., Assrir N., Jean P., Pilar Lopez-Garcia M., Marques-Soares C., Jaouen M., Dansette P. M., Sari MA. and Mansuy D. (2003). "Substrate selectivity of human cytochrome P450 2C9: importance of residues 476, 365, and 114 in recognition of diclofenac and sulfaphenazole and in mechanism-based inactivation by tienilic acid." Archives of Biochemistry and Biophysics Special Issue dedicated to R.W. Estabrook **409**(1): 80-91.
- Milési, S. (2001). Etude de la production de furocoumarines par la Rue officinale (*Ruta graveolens* L.) : cultures de plantes au champ et cultures in vitro. Laboratoire Agronomie et Environnement. Nancy, Thèse ENSAIA-INPL-INRA: 186.
- Milesi, S., Massot B., Gontier E., Bourgaud F. and Guckert A. (2001). "Ruta graveolens L.: a promising species for the production of furanocoumarins." Plant Science **161**(1): 189-199.
- Milesi, S., Massot B., Piutti S., Goergen J.L., Murano E., Toffanin R., Bourgaud F., Gontier E. and G. A. (2000). "Ruta graveolens cell cultures for psoralens production: culture in bioreactor, effect of elicitation and calcium-alginate immobilization." International Journal of Bio-Chromatography **5**(3): 213-227.
- Mizutani, M., D. Ohta and R. Sato (1997). "Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from arabidopsis and its expression manner in planta." Plant Physiology **113**(3): 755-763.
- Mizutani, M. and Y. Todoroki (2006). "ABA 8'-hydroxylase and its chemical inhibitors." Phytochem Rev.
- Morant, M., Hehn A. and werck-Reichhart. (2002). "Conservation and diversity of gene families explored using the CODEHOP strategy in higher plants." BMC Plant Biol. **1**: 2:7.
- Morant, M., G. Schoch, P. Ullmann, T. Ertunc, D. Little, C. E. Olsen, Petersen, J. Negrel and D. Werck-Reichhart (2007). "Catalytic activity, duplication and evolution of the CYP98 cytochrome P450 family in wheat." Plant Mol Biol **63**: 1-19.
- Mullen, J., Adam Gerhard, Blowers Alan and Earle Elizabeth (1998). "Biolistic transfer of large DNA fragments to tobacco cells using YACs retrofitted for plant transformation." Molecular Breeding **4**(5): 449-457.
- Mullis K. B. and Faloona F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction." Methods In Enzymology **155**: 335-350.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." Physiologia Plantarum **15**(3): 473-497.
- Musajo, L., Rodighiero G., Colombo G., Torlone V. and Dall'Acqua F. (1965). "Photosensitizing furocoumarins : interaction with DNA and photoinactivation of DNA containing viruses." Experientia **21**: 22-24.

- Mysori, K. S., Bassuner B., Deng X.B., Darbinian N.S., Motchoulski A., Ream W. and Gelvin S.B. (1998). "Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration." Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI **11**(7): 668-683.
- Nair, R. B., Xia Qun, Kartha Cyril J., Kurylo Eugen, Hirji Rozina N., Datla Raju and Selvaraj Gopalan (2002). "Arabidopsis CYP98A3 Mediating Aromatic 3-Hydroxylation. Developmental Regulation of the Gene, and Expression in Yeast." Plant Physiology **130**: 210-220.
- Naur, P., Petersen B.L., Mikkelsen M.D., Bak S., Rasmussen H., Olsen C.E. and Halkier B.A. (2003). "CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in Arabidopsis." Plant Physiology **133**(1): 63-72.
- Neal, J. J. and D. Wu (1994). "Inhibition of Insect Cytochromes P450 by Furanocoumarins." Pesticide Biochemistry and Physiology **50**(1): 43-50.
- Nedelkina, S., Jupe S.C., Blee K.A., Schalk M., Werck-Reichhart D. and Bolwell G.P. (1999). "Novel characteristics and regulation of a divergent cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A15) from French bean: engineering expression in yeast." Plant Molecular Biology **39**: 1079-1090.
- Nelson, D. R. (1999). "Cytochrome P450 and the individuality of species." Archives of Biochemistry and Biophysics **369**(1): 1-10.
- Nelson, D. R. (2006). "Plant cytochrome P450s from moss to poplar." Phytochem Rev.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder M., Wang Y. and Hofschneider P.H. (1982). "Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields." EMBO Journal **1**: 841-845.
- Nguyen, C. (1992). Contribution à l'étude de la production de psoralène (Furocoumarine) par la culture *in vitro* de plantes du genre *Psoralea* (*Leguminosae*). Nancy, Institut National Polytechnique de Lorraine: 161.
- Nitao, J. K. and A. R. Zangerl (1987). "Floral development and chemical defense allocation in wild parsnip (*Pastinaca sativa*)." Ecology **68**(3): 521-529.
- Norimoto, S., Akashi Tomoyoshi, Aoki Toshio and Ayabe Shin-ichi (2000). "Induction of isoflavonoid pathway in the model legume *Lotus japonicus*: molecular characterization of enzymes involved in phytoalexin biosynthesis." Plant Science **160**(1): 37-47.
- Ojala, T., Remes Susanna, Haansuu Pasi, Vuorela Heikki, Hiltunen Raimo, Haahtela Kielo and Vuorela Pia (2000). "Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland." Journal of Ethnopharmacology **73**(1-2): 299-305.
- Omura, T. and R. Sato (1964). "The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Evidence for its hemoprotein nature." J. Biol. Chem. **239**(8): 2370.
- Overkamp, S., Hein F. and Barz W. (2000). "Cloning and characterization of eight cytochrome P450 cDNAs from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures." Plant Science **155**: 101-108.
- Parrish, J. A., Fitzpatrick T.B., Pathak M.A. and Tanenbaum L. (1974). "Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light." N. Engl. J. Med. **291**: 1207-1211.
- Pathak M.A., Farrington D.J. and Fitzpatrick T.B. (1962). "The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants." Journal of Investigative Dermatology **39**: 225-299.

- Pathak, M. A. and T. B. Fitzpatrick (1992). "The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD." Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine **9**(1): 33-35.
- Patrick, C., Ross S. and Wen H. (1999). "Polyethylene glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection." Biochim. Biophys. Acta **1421**.
- Pereira, L., F. Villinger, H. Wulff, A. Sankaranarayanan, Raman G and A. AA. (2007). "Pharmacokinetics, toxicity, and functional studies of the selective kv1.3 channel blocker 5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen in rhesus Macaques. ." Experimental Biology and Medicine **232**: 1338-1354.
- Pierrel, M. A., Batard Y., Kazmaier M., Mignotte-Vieux C. and Durst F. (1994). "Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast. Substrate specificity of a cinnamate hydroxylase." European Journal of Biochemistry **224**(835-844).
- Plumas, J., P. Drillat, M. Jacob, Richard MJ and F. MC (2003). "Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cell proliferations." Bulletin Du Cancer **90**: 763-770.
- Poutaraud, A., Bourgaud F., Girardin P. and Gontier E. (2000). "Cultivation of rue (*Ruta graveolens* L., Rutaceae) for the production of furanocoumarins of therapeutic value." Can. J. Bot. **78**(10): 1326–1335.
- Quinlan, R. F., Jaradat T.T. and Wurtzel E.T. (2007). "Escherichia coli as a platform for functional expression of plant P450 carotene hydroxylases." Archives of Biochemistry and Biophysics. Highlight Section: Carotenoids 2007 **458**(2): 146-157.
- Ralston, L. and O. Yu (2006). "Metabolons involving plant cytochrome P450s." Phytochem Rev.
- Rech, E. L., Vianna Giovanni R. and Aragao Francisco J.L. (2008). "High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants." **3**(3): 410-418.
- Reinhard, E., Corduan G. and Volk O.H. (1968). "On the tissue cultures of *Ruta graveolens*." Planta Medica **16**(1): 8-16.
- Ro, D. K., Mah N., Ellis B.E. and Douglas C.J. (2001). "Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase." Plant Physiology **126**(1): 317-329.
- Roberts, E. S., Hopkins N.E., Alworth W.L. and Hollenberg P.F. (1993). "Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 2-ethynylphtalene: identification of an active-site peptide." Chem. Res. Toxicol. **6**: 470-479.
- Robineau, T., Batard Y., Nedelkina S., Cabello-Hurtado F., LeRet M., Sorokine O., Didierjean L. and Werck-Reichhart D. (1998). "The Chemically Inducible Plant Cytochrome P450 CYP76B1 Actively Metabolizes Phenylureas and Other Xenobiotics." Plant Physiol. **118**(3): 1049-1056.
- Ruegger, M. and C. Chapple (2001). "Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism." Genetics **159**: 1741-1749.
- Russell, D. W. and E. E. Conn (1967). "The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings." Archives of Biochemistry and Biophysics **122**(1): 256-258.
- Rylott, E. L., Jackson R.G., Edwards J., Womack G.L., Seth-Smith H.M.B., Rathbone D.A., Strand S.E. and Bruce N.C. (2006). "An explosive-degrading cytochrome P450 activity and its targeted application for the phytoremediation of RDX." Nature Biotechnology **24**(2): 216-219.

- Sahali-Sahly, Y., Balani S.K., Lin J.H. and Baillie T.A. (1996). "In vitro studies on the metabolic activation of the furanopyridine L-754,394, a highly potent and selective mechanism-based inhibitor of the cytochrome P450 3A4." Chemical Research in Toxicology **9**: 1007-1012.
- Sanford, J. (1988). "The biolistic process." Trends in Biotechnology **6**: 299-302.
- Sastry, S. S. (1997). " Isolation and partial characterization of a novel psoralen-tyrosine photoconjugate from a photoreaction of psoralen with a natural protein." Photochem Photobiol. **65**(6): 937-944.
- Schmitt, I. M., Maxwell V.M., Olack G.A., Edelson R.L., Chimenti S. and Gasparro F.P. (1994). "The specific effects of 8-MOP photoadducts on cell growth : HPLC analysis of monoadducted and crosslink formation in cells exposed to split-dose treatment." J. Photochem. Phobiol. B. **22**(1): 17-21.
- Schoch, G., Goepfert Simon, Morant Marc, Hehn Alain, Meyer Denise , Ullmann Pascaline and Werck-Reichhart Danièle (2001). "CYP98A3 from Arabidopsis thaliana Is a 3'-Hydroxylase of Phenolic Esters, a Missing Link in the Phenylpropanoid Pathway." The journal of biological chemistry **276**(39): 36566–36574.
- Schuler, M. A. and D. Werck-Reichhart (2003). "FUNCTIONAL GENOMICS OF P450S." Annual Review of Plant Biology **54**(1): 629-667.
- Scott, B. R., Pathak M.A. and Mohn G.R. (1976). "Molecular and genetic basis of fuocoumarin reactions." Mutation Research Letters **39**: 29-74.
- Scott, J. G. (1996). "Inhibitors of CYP6D1 in house fly microsomes." Insect Biochemistry and Molecular Biology **26**(7): 645-649.
- Scott, J. G., Liu N. and Wen Z. (1998). "Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **121**(1-3): 147-155.
- Seitz, C., Ameres S. and Forkmann G. (2007). "Identification of the molecular basis for the functional difference between flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase." FEBS Letters **581**(18): 3429-3434.
- Sharma, S. K., Garrett J.M. and Brown S.A. (1979). "Separation of the S-adenosylmethionine: 5- and 8-hydroxyfuranocoumarin O-methyltransferases of Ruta graveolens L. by general ligand affinity chromatography. "" Z Naturforsch. **34C**(5-6): 387-391.
- Siminszky, B., A. M. Freytag, B. S. Sheldon and R. E. Dewey (2003). "Co-expression of a NADPH:P450 reductase enhances CYP71A10-dependent phenylurea metabolism in tobacco." Pesticide Biochemistry and Physiology **77**(2): 35-43.
- Song, P. S. and K. J. Tapley (1979). "Photochemistry and photobiology of psoralens." Photochemistry and Photobiology **29**: 1177-1197.
- Specht, K. G., Midden R.W and Chedekel M.R. (1989). "Photocycloaddition of 4,5',8-trimethyl-psoralen and oleic acid methyl ester: product structures and reaction mechanism." J.Org.Chem. **54**: 4125-4134.
- Sridar, C., Harleton E. and Hollenberg P.F. (2005). "Roles of the threonine 407, aspartic acid 417, and threonine 419 residues in P450 2B1 in metabolism." Biochemical and Biophysical Research Communications **338**(1): 386-393.
- Stachel, S. E. and P. C. Zambryski (1986). "virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of A. tumefaciens." Cell **46**(3): 325-333.

- Stanjek, V., Miksch M. and Boland W. (1997). "Stereoselective syntheses of deuterium labelled marmesins ; valuable metabolic probes for mechanistic studies in furanocoumarin biosynthesis." Tetrahedron **53**(52): 17699-17710.
- Stanjek, V., J. Piel and W. Boland (1999). "Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in *Apium graveolens* (Apiaceae)." Phytochemistry **50**(7): 1141-1146.
- Stracke, R., M. Werber and B. Weisshaar (2001). "The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*." Current Opinion in Plant Biology **4**(5): 447-456.
- Sundberg, C., Meek L., Carroll K., Das A. and Ream W. (1996). "VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells." Journal Of Bacteriology **178**(4): 1207-1212.
- Thompson, C. J., Movva N.R., Tizard R., Crameri R., Davies J.E., Lauwereys M. and Botterman J. (1987). "Characterization of herbicide resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*." EMBO Journal **6**: 2519-2523.
- Thompson, H. J., Sharma Satish K. and Brown Stewart A. (1978). "O-methyltransferases of furanocoumarin biosynthesis." Archives of Biochemistry and Biophysics **188**(2): 272-281.
- Tietjen, K. G., D. Hunkler and U. Matern (1983). "Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. Identification of induced products as coumarin derivatives." European Journal of Biochemistry **131**(2): 401-407.
- Tijet, N. and A. R. Brash (2002). "Allene oxide synthases and allene oxides." Prostaglandins & Other Lipid Mediators **68-69**(423-431).
- Tinland, B. (1996). "The integration of T-DNA into plant genomes." Trends in Plant Science **1**(6): 178-184.
- Tsukamoto, K., Watanabe T., Nagashima U. and Akiyama Y. (2005). "Hartree-Fock and density functional theory calculations for the reaction mechanism of nitric oxide reductase cytochrome P450nor from *Fusarium oxysporum*." Journal of Molecular Structure: THEOCHEM **732**(1-3): 87-98.
- Urlacher, V. B. and S. Eiben (2006). "Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application." Trends in Biotechnology **24**(7): 324-330.
- Veronese, F. M., Schiavon O., Bevilacqua R., Bordin F. and Rodighiero G. (1982). "Photoinactivation of enzymes by linear and angular furocoumarins." Photochem. Photobiol. **36**(1): 25-30.
- Vyvyan, J. R. (2002). "Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals." Tetrahedron **58**(9): 1631-1646.
- Ward, D. V., Zupan John R. and Zambryski Patricia C. (2002). "Agrobacterium VirE2 gets the VIP1 treatment in plant nuclear import." Trends in Plant Science **7**(1): 1-3.
- Weaver, L. M. and K. M. Herrmann (1997). "Dynamics of the shikimate pathway in plants." Trends in Plant Science **2**(9): 346-351.
- Weisshaar, B. and G. I. Jenkins (1998). "Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation." Current Opinion in Plant Biology **1**(3): 251-257.
- Wen, Z., Pan Liping, Berenbaum May R. and Schuler Mary A. (2003). "Metabolism of linear and angular furanocoumarins by *Papilio polyxenes* CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase." Insect Biochemistry and Molecular Biology **33**(9): 937-947.

- Weng-Sheng, X., Xiang-Jing W., Tian-Rui R. and Su-Quin C. (2006). "Purification of recombinant wheat cytochrome P450 monooxygenase expressed in yeast and its properties." Protein Expr Purif **45**(1): 54-59.
- Werck-Reichhart, D. and R. Feyereisen (2000). "Cytochrome P450: a success story." Genome Biology **1**(6): 3003.1-3003.9.
- Whitbred, J. M. and M. A. Schuler (2000). "Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea." Plant Physiol. **124**(1): 47-58.
- Wust M., Little D.B., Schalk M. and Croteau R. (2001). "Hydroxylation of Limonene Enantiomers and Analogs by Recombinant (-)-Limonene 3- and 6-Hydroxylases from Mint (*Mentha*) Species: Evidence for Catalysis within Sterically Constrained Active Sites." Archives of Biochemistry and Biophysics **387**(1): 125-136.
- Yamada, T., Y. Kambara, H. Imaishi and H. Ohkawa (2000). "Molecular Cloning of Novel Cytochrome P450 Species Induced by Chemical Treatments in Cultured Tobacco Cells." Pesticide Biochemistry and Physiology **68**(1): 11-25.
- Yoshikazu, T. (2006). "Flower colour and cytochromes P450." Phytochem Rev.
- Zangerl, A. R. and M. R. Berenbaum (1987). "Furanocoumarins in wild parsnip : effect of photosynthetically active radiation, ultraviolet light and nutrients." Ecology **68**(3): 316-320.
- Zarebska, Z., Waszkowska E., Caffieri S. and Dall'Acqua F. (2000). "PUVA (psoralen+UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells." Il Farmaco **55**(8): 515-520.
- Zhao, H., Lu Jing, Lu Shiyu, Zhou Yihua, Wei Jianhua, Song Yanru and Wang Tai (2005). "Isolation and functional characterization of a cinnamate 4-hydroxylase promoter from *Populus tomentosa*." Plant Science **168**(5): 1157-1162.
- Zhen, Z., Baolin S., Chunming L., Guifang X. and Xianghui L. (1994). "Transformation of wheat protoplasts mediated by cationic liposome and regeneration of transgenic plantlets." Chin. J. Biotechnol. **9**: 258-261.
- Zhengquan, H., Fu Yaping, Si Huamin, Hu Guocheng, Zhang Shihong, Yu Yonghong and Sun Zongxiu (2004). "Phosphomannose-isomerase (pmi) gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium*." Plant Science **166**(1): 17-22.
- Zhou, S., Koh H.-L., Gao Y., Z.-Y. Gong and Lee E. J. D. (2004). "Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly." Life Sciences **74**(8): 935-968.
- Zhu, J., Oger P.M., Schrammeijer B., Hooykaas P.J., Farrand S.K. and Winans S.C. (2000). "The bases of crown gall tumorigenesis." Journal Of Bacteriology **182**(14): 3885-3895.
- Zobel, A. M. and S. A. Brown (1988). "Determination of furanocoumarins on the leaf surface of *Ruta graveolens* with an improved extraction technique." J. Nat. Prod. **51**: 941-946.
- Zobel, A. M. and S. A. Brown (1989). "Histological localization of furanocoumarins in *Ruta graveolens* shoots." Can. J. Bot. **67**: 915-921.
- Zobel, A. M. and S. A. Brown (1990). "Dermatitis-inducing furanocoumarins on leaf surfaces of eight species of Rutaceous and Umbelliferous plants." Journal of Chemical Ecology **16**(3): 693-700.
- Zobel, A. M. and S. A. Brown (1993). "Furocoumarins on the surface of callus cultures from species of the Rutaceae and Umbelliferae." Canadian journal of botany **71**: 966-969.
- Zumwalt, J. G. and J. J. Neal (1993). "Cytochromes P450 from *Papilio polyxenes*: adaptations to host plant allelochemicals." Comparative Biochemistry and Physiology **106C**(1): 111-118.

Références bibliographiques

Zupan, J. and P. Zambryski (1995). "Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell."
Plant Physiology **107**(4): 1041-1047.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ooo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Danièle WERCK-REICHHART, Directeur de Recherche, IBMP, Strasbourg

Monsieur Benoît SAINT PIERRE, Professeur, UFR Sciences Pharmaceutiques,

Université de Tours, Tours

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur DOERPER Sébastien

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Modification de la synthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L. par une
approche de génie métabolique"**

en vue de l'obtention du titre de :

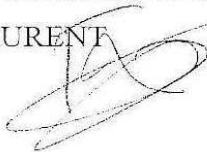
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Sciences agronomiques »

Fait à Vandoeuvre, le 28 octobre 2008

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



Modification de la synthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique.

La rue officinale (*Ruta graveolens* L.) est une plante connue comme étant particulièrement riche en métabolites secondaires et produisant notamment des molécules d'intérêt pharmaceutique comme les furocoumarines. Nous avons tenté par une approche de génie métabolique d'augmenter la teneur en furocoumarines produites dans les plantes. La mise en place de telles approches nous a également permis de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Pour atteindre ces objectifs nous avons transformé la rue avec différents gènes placés sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort, le promoteur 35S du CaMV. Pour chaque série de transformants nous avons étudié la teneur en furocoumarines et analysé les variations de composés phénylpropanoïdes (rutine, umbelliférone, ferulate, scopolétine). Parallèlement à cette analyse métabolique, une corrélation a été réalisée avec le niveau d'expression des transgènes et de certains endogènes par l'utilisation d'approche de PCR quantitative.

Les séries de plantes transgéniques surexprimant les gènes codants pour la Coumaroyl ester 3'-Hydroxylase de rue (CYP98A22) et d'*A. thaliana* (CYP98A3) présentent toutes les deux une augmentation significative d'un facteur 3 de la teneur en furocoumarines. Par contre si les premières sont caractérisées par une diminution de la production en rutine et en umbelliférone, les secondes présentent une augmentation importante de la teneur en Scopolétine et en umbelliférone. Ces résultats suggèrent la coexistence de deux C3'H chez *R. graveolens* ayant des fonctions différentes, l'une d'entre elles étant impliquée directement ou non dans la synthèse de scopolétine. Si la transformation génétique de rues avec des gènes de la famille CYP98A induit des modifications du métabolisme secondaire, la surexpression d'un gène spécifique à la voie de biosynthèse des furocoumarines (gène *cyp71AJ1*, codant pour la psoralène synthase d'*A. majus*) permet d'augmenter uniquement la teneur en furocoumarines (X4).

L'ensemble de ces travaux a permis de montrer l'intérêt d'une approche de génie métabolique pour générer des plantes présentant un intérêt potentiel pour la production de molécules d'intérêts pharmaceutiques.

Mots clés : Furocoumarines, Psoralène, phénylpropanoïdes, *Ruta graveolens*, transformation génétique, génie métabolique, Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H), Coumaroyl 3'-Hydroxylase (C3'H), Psoralène Synthase (PS)

A metabolic engineering approach to generate modification of furanocoumarin synthesis in *Ruta graveolens* L.

Garden Rue (*Ruta graveolens* L.) is a plant known as being particularly rich in secondary metabolites and in particular producing molecules of pharmaceutical interest like furocoumarines. By the use of a metabolic engineering approach, we tried to increase the content of furocoumarines produced in these plants but also to better understand the regulation mechanisms of the phenylpropanoid biosynthesis pathway. To achieve these goals we transformed Ruta plants with various genes placed under the control of a strong constitutive promoter, CaMV 35S promoter. The plants we obtained were analyzed for their ability to overproduce furocoumarines but also other phenylpropanoids like ferulate, umbelliferone, scopoletine or rutin. Using Real Time PCR experiments, a correlation was carried out with the level of expression of each transgene and several endogenous genes. Plants overexpressing either the Ruta or the Arabidopsis Coumaroyl ester 3'-Hydroxylase (CYP98A22 and CYP98A3 respectively) display both a significant increase (3 time level) of the furocoumarin. However if the S-98A22 plants are characterized by a reduction in the production of rutin and umbelliferone, S-98A3 transgenic plants display a significant increase scopoletine and umbelliferone content. These results suggest the coexistence of two C3'H having different functions in Ruta. One of them might be involved more specifically in the synthesis of scopoletine.

If the transformation of Ruta with genes belonging to the CYP98A family generates an enlarged of the secondary metabolism, we also showed that the overexpression of a gene belonging to the furocoumarins biosynthesis pathway (CYP71AJ1, the psoralen synthase) allowed a specific stimulation. Indeed a 4 time increase of the content of furocoumarins was noticed in these transgenic plant lines.

This work made it possible to make evidence of the interest of a metabolic engineering approach to generate plants of interest for the production of pharmaceutical molecules.

Keys words: Furocoumarins, psoralen, phenylpropanoids, *Ruta graveolens*, genetic transformation, metabolic engineering, Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H), Coumaroyl 3'-Hydroxylase (C3'H), Psoralen Synthase (PS).