



HAL
open science

Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT).

Laurent L. Hoffmann

► **To cite this version:**

Laurent L. Hoffmann. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT).. Biologie cellulaire. Université Louis Pasteur - Strasbourg I, 2003. Français. NNT: . tel-00003598

HAL Id: tel-00003598

<https://theses.hal.science/tel-00003598>

Submitted on 17 Oct 2003

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

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

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I

2003

THESE

présentée à

LA FACULTE DES SCIENCES DE LA VIE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

Domaine : **BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE**

par

Laurent HOFFMANN

Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT).

Soutenue le **4 juillet 2003** devant la Commission d'Examen :

Mme C. LAPIERRE

RAPPORTEUR EXTERNE

M. B. ST-PIERRE

RAPPORTEUR EXTERNE

M. T. BACH

RAPPORTEUR INTERNE

M. M. LEGRAND

DIRECTEUR DE THESE

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS), Strasbourg

« ... la diversité doit être considérée comme un don, puisqu'il faut être divers pour échanger et échanger pour progresser. »

Axel Kahn
Et l'Homme dans tout ça ?

A mes parents
A Stéphanie

Je tiens à remercier tout d'abord Bernard Fritig et Michel Legrand pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe de phytopathologie et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour réaliser ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à Michel Legrand. Sa compétence et sa disponibilité ont été des atouts précieux.

Je voudrai remercier Madame C. Lapierre et Messieurs T. Bach et B. St-Pierre d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Un grand merci à Pierrette Geoffroy pour sa rigueur, sa gentillesse et sa disponibilité. Ses compétences techniques et son efficacité ont fortement contribué à la réalisation de ces travaux.

Merci à Gaëlle Pinçon et Stéphane Maury qui m'ont encadré et formé pendant mon année de DEA.

Je tiens à remercier Denise Meyer pour son aide technique concernant la cytochimie et Marc Bergdoll pour les études bioinformatiques.

Je remercie également Christophe Ritzenthaler pour ces précieux conseils en microscopie, nos nombreuses discussions scientifiques et sa collaboration enrichissante.

Mes remerciements iront également à Paul Schellenbaum pour m'avoir permis de découvrir les joies de l'enseignement à l'IUT de Colmar, en tant que vacataire puis en tant qu'ATER. Une pensée amicale aux collègues de l'IUT pour leur soutien et leur aide, ainsi qu'aux étudiants.

Merci aux stagiaires que j'ai eu la joie et le plaisir d'encadrer : Michel Undreiner, Laurence Baumann, Sigrid Malfait, Laurette De Franco et Sébastien Besseau, pour leur rigueur et leur contribution à ce travail.

Un grand merci à toutes les personnes qui, grâce à leur disponibilité et à leur bonne humeur, m'ont soutenu en rendant agréable les moments passés ensemble : Guigui, Samie (trop la classe !), Alban, Sylvain, Seb, Ahmed, Nanard, Manu, Marie G., Sophie, Daniel, Nadège, Zaza, Cécile, Zack, Tatiana, Clément, Mahlek, Philippe H. Laurent C., Sylvain D., Ester G., Patrick, Claire, Thierry, Julie, Rozenne, Gwendoline, Mailys, Guillaume G., Pascaline D., Olivier V., Gilles, Marc O.,...

Une tendre pensée pour Eva, pour sa patience, sa présence à mes côtés et sa contribution à l'élaboration de ce manuscrit.

ABBREVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ADN-T	:	ADN transféré
<i>Arabidopsis</i>	:	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ARN	:	acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messenger
ATP	:	adénosine triphosphate
BSA	:	bovine serum albumin
CHI	:	chalcone isomérase
CHS	:	chalcone synthase
C3H	:	<i>trans</i> -cinnamate 3-hydroxylase
C4H	:	<i>para</i> -coumarate 4-hydroxylase
4CL	:	4-coumarate CoA ligase
CAD	:	alcool cinnamylique déshydrogénase
CaMV	:	cauliflower mosaic virus
Cald	:	coniféraldéhyde
CatOMT	:	catéchol OMT
CCoA	:	caféoyl-CoA
CCM	:	chromatographie sur couche mince
CCR	:	cinnamoyl-CoA réductase
CoA	:	coenzyme A
CoASH	:	coenzyme A réduit
CCoAOMT	:	caféoyl-CoA <i>O</i> -méthyltransférase
CGA	:	acide chlorogénique
CHS	:	chalcone synthase
CLHP	:	chromatographie liquide haute performance
COMT	:	acide caféique <i>O</i> -méthyltransférase
CPG-SM	:	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
cv.	:	cultivar
dNTP	:	désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
DCG	:	alcool déhydroconiférylique glucoside
DO	:	densité optique
dpi	:	jours après infiltration (days post-inoculation)
DTT	:	dithiothréitol
EDTA	:	éthylène diamine tétra-acétate
EST	:	expressed sequenced tag
F5H	:	férulate 5-hydroxylase
G	:	gàïacyle
GUS	:	β -glucuronidase
H	:	para-hydroxyphényle
HCA	:	acide hydroxycinnamique
HCT	:	HydroxyCinnamoyl-Transférase
HCT -	:	plant de <i>N. benthamiana</i> réprimé pour l'expression du gène <i>HCT</i>
HRGP	:	hydroxyproline-rich glycoprotein
kb	:	kilobase
kDa	:	kiloDalton
<i>N. benthamiana</i>	:	<i>Nicotiana benthamiana</i>

<i>N. tabacum</i>	:	Nicotiana tabacum
5-OHG	:	5-hydroxygaïacyle
OMT	:	O-méthyltransférase
PAL	:	phényalanine ammoniac-lyase
pb	:	paire de bases
PCR	:	polymerase chain reaction
PF	:	poids frais
PR	:	pathogenesis related
RE	:	réticulum endoplasmique
RH	:	réaction d'hypersensibilité
RMN	:	résonance magnétique nucléaire
RT-PCR	:	transcription réverse suivie d'une PCR
S	:	syringyle
SA	:	acide salicylique
SAD	:	alcool sinapylique déshydrogénase
SAH	:	S-adénosyl-L-homocystéine
SAM	:	S-adénosyl-L-méthionine
SAR	:	systemic acquired resistance
SDS	:	dodécylsulfate de sodium
SM	:	sinapoylmalate
SS	:	stilbène synthase
TRV	:	Tobacco Rattle Virus
U.V.	:	ultraviolet
UA	:	unité d'aire
VIGS	:	Virus Induced Gene Silencing
VMT	:	virus de la mosaïque du tabac
WT	:	wild type

SOMMAIRE

Introduction générale	1
1. Le métabolisme des phénylpropanoïdes	4
1.1 Rôle du métabolisme des phénylpropanoïdes chez les plantes	4
1.2 Les produits dérivés du métabolisme des phénylpropanoïdes	5
1.2.1 Les coumarines.....	5
1.2.2 Les stilbènes, les flavonoïdes et dérivés.....	6
1.2.3 Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques, dont l'acide chlorogénique	6
1.2.4 La subérine.....	9
1.2.5 La lignine	10
1.3 Les enzymes de la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes	10
1.3.1 La phénylalanine ammoniac lyase (PAL)	10
1.3.2 La cinnamate 4-hydroxylase (C4H)	12
1.3.3 La <i>p</i> -coumarate 3-hydroxylase (C3H).....	12
1.3.4 Les <i>O</i> -méthyltransférases (OMTs).....	13
1.3.4.1 Les <i>caféoyl</i> -CoA OMTs (CCoAOMTs).....	14
1.3.4.2 Les <i>acide caféique</i> OMTs (COMTs).....	15
1.3.5 La férulate 5-hydroxylase (F5H).....	16
1.3.6 La coumarate CoA ligase (4CL)	17
1.4 Les enzymes spécifiques de la voie de biosynthèse de la lignine.....	19
1.4.1 La cinnamoyl-CoA réductase (CCR)	19
1.4.2 La cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD).....	20
1.4.3 Stockage et transport des unités monolignols	21
1.4.3.1 L'alcool coniférylique UDP-glucose glucosyltransférase.....	21
1.4.3.2 La coniférine β -glucosidase	22
1.4.4 Polymérisation des unités monolignols.....	23
1.4.4.1 Les peroxydases	23
1.4.4.2 Les laccases.....	24
1.5 Le métabolisme des phénylpropanoïdes et les réponses aux stress.....	25
1.5.1 Inductibilité des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes	26
1.5.2 Identification et fonctions des dérivés phénylpropanes produits dans les situations de stress	27
1.6 Les mécanismes de régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes	29
1.6.1 Les éléments <i>cis</i> régulateurs.....	29
1.6.2 Les facteurs de transcription	30
1.6.3 Autres mécanismes de régulation.....	32
2. La lignine	32
2.1 Rôle de la lignine	32
2.2 Les tissus conducteurs et le processus de lignification	33
2.2.1 Le système vasculaire.....	33
2.2.2 Le processus de lignification de la paroi cellulaire végétale	34
2.3 Nature chimique et hétérogénéité des polymères de lignine.....	35
2.3.1 Les monolignols.....	35
2.3.2 Les liaisons chimiques	35
2.3.3 Hétérogénéité des polymères de lignine.....	36
2.3.4 Analyse chimique de la lignine	37

2.4	Importance économique de la lignine.....	37
2.5	Modulation par génie génétique de la voie de biosynthèse de la lignine.....	38
2.5.1	Modulation de l'expression de la PAL.....	39
2.5.2	Modulation de l'expression de la C4H.....	40
2.5.3	Modulation de l'expression de la C3H : analyse du mutant <i>ref8</i> affecté dans l'expression du gène <i>C3H</i>	41
2.5.4	Modulation de l'expression de la COMT.....	41
2.5.5	Modulation de l'expression de la CCoAOMT.....	42
2.5.6	Modulation de l'expression de la F5H par transgénèse et analyse du mutant <i>fah 1-2</i> affecté dans l'expression du gène <i>F5H</i>	43
2.5.7	Modulation de l'expression de la 4CL.....	44
2.5.8	Modulation de l'expression de la CCR par transgénèse et analyse du mutant <i>irx4</i> affecté dans l'expression du gène <i>CCR</i>	44
2.5.9	Modulation de l'expression de la CAD par transgénèse et analyse de mutants naturels.....	45
2.5.10	Modulation de l'expression des peroxydases.....	46
2.5.11	Modulation de l'expression des laccases.....	47
2.5.12	Modulation de l'expression d'autres gènes affectant la biosynthèse de la lignine.....	47
2.5.13	Conclusions.....	48
2.6	Notre connaissance de la voie de biosynthèse de la lignine : synthèse des dernières avancées.....	50
2.7	Le coenzyme A ou « coenzyme d'Acylation ».....	52
3.	La voie du shikimate.....	53
3.1	Importance de la voie métabolique du shikimate.....	53
3.2	Les enzymes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques.....	54
3.2.1	Les enzymes du tronc principal, la voie préchorismate.....	54
3.2.1.1	<i>La 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase</i>	54
3.2.1.2	<i>La 3-déhydroquinone (DHQ) synthase</i>	55
3.2.1.3	<i>La 3-déhydroquinone (DHQ) déhydratase et shikimate déhydrogénase</i>	55
3.2.1.4	<i>La shikimate kinase</i>	55
3.2.1.5	<i>La 5-énolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) synthase</i>	55
3.2.1.6	<i>La chorismate synthase</i>	56
3.2.2	Les enzymes conduisant à la synthèse de la phénylalanine et de la tyrosine (Fig. 62A).....	56
3.2.3	Les enzymes conduisant à la synthèse du tryptophane (Fig. 62B).....	57
3.3	Localisation subcellulaire de la voie du shikimate.....	57
3.4	Les produits dérivés et fonctions de la voie du shikimate.....	58
3.5	Régulation de la voie du shikimate en réponse à des stimuli développementaux et environnementaux.....	59
	Objectifs des travaux de thèse.....	61

Chapitre I : Caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase de tabac, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT).. 62

PARTIE I : Purification, clonage et caractérisation biochimique d'une acyltransférase de tabac contrôlant le pool des esters shikimiques et quiniques, intermédiaires métaboliques de la voie des phénylpropanoïdes. 62

1. Introduction.....	62
2. Article 1. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism.....	65
3. Compléments d'information sur la superfamille « BAHD » des acyltransférases dépendantes des esters de CoA.....	75
3.1 Introduction.....	75
3.2 Les acyltransférases dépendantes des « esters de CoA activés »	75
3.3 La superfamille « BAHD » des acyltransférases dépendantes des esters de CoA.....	76

PARTIE II : La répression du gène HCT, grâce à l'infection par un virus recombinant (approche « Virus Induced Gene Silencing », VIGS), affecte le métabolisme des phénylpropanoïdes et modifie les processus de lignification des tissus conducteurs... 78

1. Introduction.....	78
2. Article 2. Silencing of hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase (HCT) affects lignin biosynthesis.....	80
3. Résultats complémentaires.....	102
3.1 Clonage d'un fragment d'ADNc du gène codant pour HCT chez <i>N. benthamiana</i>	102
3.2 Analyse histologique des tissus conducteurs de plants de <i>N. benthamiana</i> dont le gène <i>HCT</i> est réprimé ..	102
3.3 Analyse par CLHP de la teneur en composés phénoliques solubles de tige et de feuilles de plants de <i>N. benthamiana</i> dont le gène <i>HCT</i> est réprimé.....	103
3.4 L'enzyme HCT peut-elle jouer un rôle dans les mécanismes de résistance des plantes aux agents pathogènes? Mesure de l'activité HCT lors de la réaction d'hypersensibilité (RH) du tabac vis-à-vis du VMT.	106

CONCLUSIONS..... 108

Chapitre II : Détermination du site actif de la caféoyl-coenzyme A 3-O méthyltransférase (CCoAOMT) de tabac impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes; modélisation tridimensionnelle et mutagenèse dirigée. 109

1. Introduction.....	109
1.1 Les <i>O</i>-méthyltransférases impliquées dans la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes	110
1.1.1 Les COMTs.....	110
1.1.2 Les CCoAOMTs	110
1.2 Diversité et signatures des méthyltransférases S-adénosyl-L-méthionine-dépendantes de plantes	111
1.3 Comparaison des CCoAOMTs de plantes avec les catéchol OMTs animales et modèle tridimensionnel de la CCoAOMT de tabac	112
1.4 Analyses biochimiques et identification du site actif de la CCoAOMT de tabac.....	113
2. Article 3. Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis.....	115

Discussion et perspectives..... 124***L'acyltransférase de tabac (HCT) et le métabolisme des phénylpropanoïdes* 125**

Spécificité de substrat de l'enzyme HCT 125

Rôle physiologique de l'enzyme HCT 126

Le gène HCT et la lignification 126*Le gène HCT et la voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique (CGA)* 128*Le gène HCT et les mécanismes de défense des plantes* 130***Stratégie d'isolement de nouvelles acyltransférases impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes : approche phylogénétique chez Arabidopsis*..... 131*****Approches bioinformatiques* :..... 133**

La CCoAOMT de tabac 134

La COMT I de tabac 135

Modélisation de la COMT II, une classe d'OMTs à part chez le tabac..... 137

Etudes structurales de l'enzyme HCT 138

Matériel et méthodes 140

Le matériel et les méthodes présentés dans cette partie concernent uniquement les résultats complémentaires du premier chapitre. Le reste des techniques et l'ensemble des informations nécessaires à la compréhension des expériences sont détaillés dans chacun des articles 1, 2 et 3..... 140

1. Matériel végétal et inoculation du virus 140**2. Extraction et analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) des phénols solubles et pariétaux de *Nicotiana benthamiana* 140**2.1. Protocole d'extraction des phénols (Tamagnone *et al.*, 1998a; Keller *et al.*, 1996) 140

2.2. Analyse par CLHP des phénols extraits 141

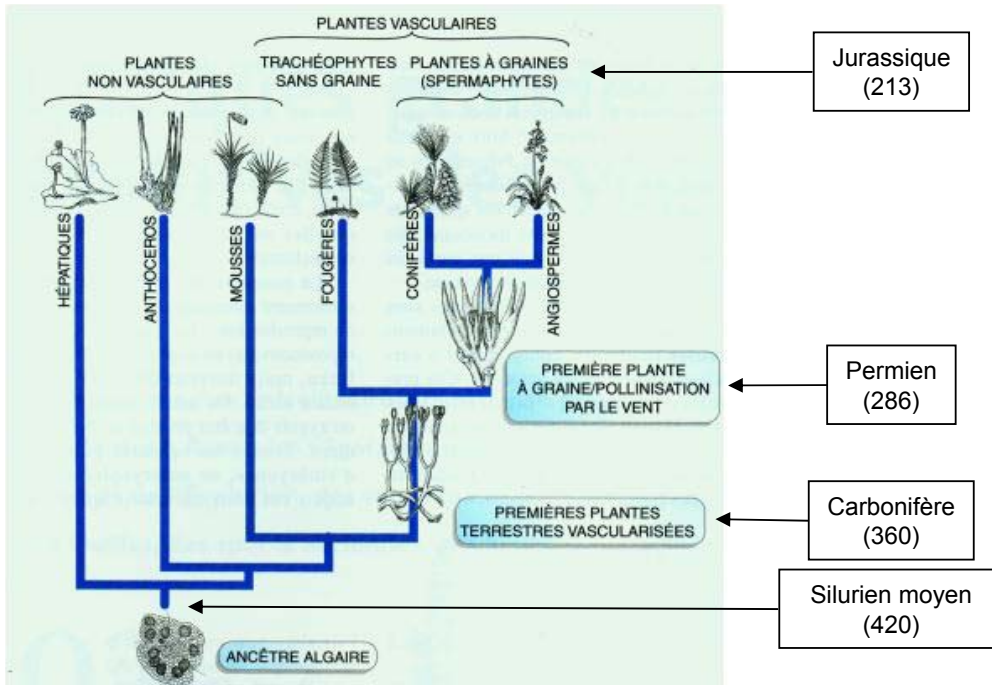
3. Analyses histologiques au bleu de toluidine 142**Bibliographie..... 143**

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

1. LE METABOLISME DES PHENYLPROPANOÏDES	4
2. LA LIGNINE	32
3. LA VOIE DU SHIKIMATE	53
OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	61

Echelle des temps
(en millions d'années) :



(Illustration : http://intra-ibmp.u-strasbg.fr/sg/microscopie/cvme/mat_cyto/catalogue1.html)

Figure 1. Apparition et évolution des organismes photosynthétiques terrestres.

Introduction générale

C'est au Silurien moyen, il y a environ 420 millions d'années, que le retrait progressif des océans a favorisé l'adaptation de certains organismes aquatiques et photosynthétiques au milieu terrestre (**Fig. 1**). Cette adaptation a nécessité des transformations de l'appareil végétatif et reproducteur des plantes visant essentiellement à faire face à l'absence d'eau et à croître dans le milieu aérien, tout en luttant contre l'attraction terrestre. Au cours de l'évolution, cette transition, dans sa complexité structurale et physiologique, est considérée comme étant un des événements les plus significatifs de l'histoire des plantes terrestres.

Pendant plusieurs millions d'années, les plantes terrestres sont restées extrêmement petites et de structure simple. Puis, l'appareil végétatif s'est progressivement transformé en un système d'axes rampants et dressés, possédant des tissus structurellement et fonctionnellement spécialisés et bien différenciés. Ces écosystèmes très diversifiés ont permis de transformer le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère en énergie chimique.

Les échanges gazeux ont été facilités par la formation d'ouvertures naturelles à la surface des plantes, les stomates. L'apparition de ces pores, raccordant les organes internes de la plante à l'environnement extérieur, a également eu pour conséquence d'augmenter les pertes en eau par évapotranspiration. Puis, l'édification d'un port végétal de grande taille a exigé un apport d'eau suffisant et constant dans toute la plante. Cette obligation d'hydratation a conduit à la création de tissus spécialisés, le système vasculaire, qui assure le transport de l'eau à partir de l'interface plante-sol (le système racinaire) vers les parties aériennes de la plante. Au sein du système vasculaire, deux types de tissus conducteurs ont permis d'irriguer toutes les parties de la plante : les vaisseaux du xylème transportant l'eau et les éléments minéraux (la sève brute) et les vaisseaux du phloème responsables de la distribution des produits organiques issus de la photosynthèse (la sève élaborée).

De nombreuses études sur l'évolution des plantes vasculaires ont montré une corrélation entre la complexité de la stature des plantes terrestres et l'évolution des cellules spécialisées dans le transport de l'eau, les trachéides (Friedman et Cook, 2000). Ces cellules spécialisées dans le transport de l'eau sont issues d'une différenciation complexe conduisant à la mort programmée des cellules (Roberts et McCann, 2000; Jones, 2001). Le taux de conductance des trachéides a été estimé comme étant 10^7 fois supérieur à celui de cellules vivantes équivalentes avec leur contenu cytoplasmique. Cette propriété physiologique est directement reliée à la synthèse et au dépôt d'un polymère structural complexe, rigide et hydrophobe : la lignine.

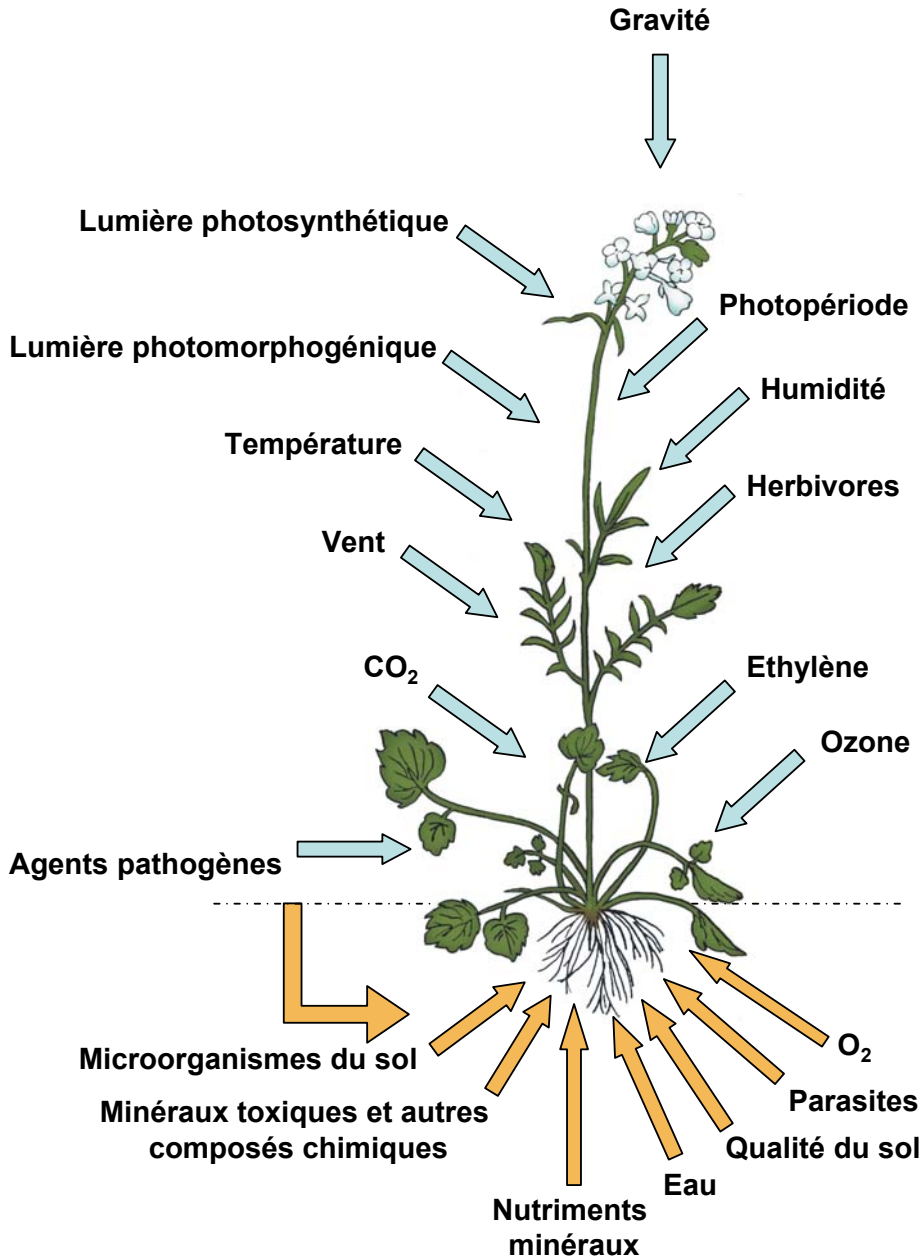


Figure 2. Signaux environnementaux de nature physique, chimique ou biologique, pouvant affecter la croissance et le développement des plantes (Buchanan *et al.*, 2001).

La différenciation du xylème a également permis de renforcer la résistance mécanique des axes de la plante et donc d'assurer un déploiement de l'appareil végétatif dans l'espace aérien. Les axes se sont ensuite différenciés pour former les différents organes que sont la tige, les feuilles, les racines et les fleurs. La surface de la terre a rapidement été dominée par des forêts de Ptéridophytes (fougères), de Gymnospermes (conifères) et d'Angiospermes.

Au cours de leur évolution les plantes terrestres ont dû s'adapter pour faire face à de nombreuses autres contraintes. Les plantes sont des organismes sédentaires, et dans leur environnement, elles sont sujettes à une multitude de stress de nature abiotique et biotique (**Fig. 2**). Parmi les facteurs abiotiques, on trouve notamment les températures extrêmes, les rayonnements U.V., les carences ou les excès en éléments minéraux essentiels ou toxiques. Les végétaux sont également au contact de nombreux micro-organismes tels que les champignons, les bactéries et les virus, dont certains sont pathogènes. Cependant, au cours de l'évolution, les plantes ont su élaborer des systèmes d'adaptation et de défense efficaces leur permettant le plus souvent de tolérer et de résister à toutes ces agressions extérieures. Sous l'effet de la pression de sélection, les plantes se sont perpétuellement adaptées au milieu environnant, notamment en modelant leur métabolisme et en synthétisant de nouvelles molécules. Les voies biochimiques essentielles à la vie de la plante telles que la photosynthèse, la glycolyse ou encore la synthèse des acides aminés ont conduit au cours de l'évolution à la mise en place de nouvelles étapes enzymatiques donnant naissance à leur tour à des molécules aux fonctions nouvelles. Ces voies alternatives, souvent spécifiques du règne végétal, ont été regroupées sous le terme de métabolisme secondaire, en opposition au métabolisme primaire. Nous pouvons citer les voies métaboliques secondaires conduisant aux alcaloïdes, aux terpénoïdes ou encore aux phénylpropanoïdes.

Prenons l'exemple de l'interaction entre une plante et un agent pathogène. L'issue de l'interaction est dépendante du pouvoir pathogène de l'agresseur mais aussi de la capacité de la plante à résister à l'infection. Lorsque les plantes sont soumises à l'agression d'un agent pathogène, elles disposent d'un certain nombre de moyens de résistance préexistants tels que la cuticule (polymère présent à la surface des feuilles) ou la paroi cellulaire. Passé cette première barrière physique, l'agent pathogène peut infecter la plante, s'y développer et conduire à la maladie. Mais la progression de l'agent pathogène peut être également stoppée par une défense active de la plante. Cette résistance active est caractérisée par l'induction de l'expression de gènes responsables de la mise en place d'un certain nombre de processus qui vont permettre à la plante de lutter contre la propagation de l'agent pathogène. La plante va se défendre notamment en augmentant la résistance mécanique de ses parois cellulaires grâce au dépôt de polymères tels que la lignine et la callose. L'accumulation de protéines de défense notamment des protéines PR (Pathogenesis-Related) et la synthèse de molécules signal (acide salicylique, acide jasmonique) font partie de la panoplie d'armes dont dispose la plante. La

stimulation des voies métaboliques secondaires constitue une part importante de cette stratégie de lutte. L'induction de l'expression de gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes va conduire à la synthèse de nombreux composés phénoliques aux fonctions aussi variées qu'essentiels.

Mon travail de thèse a consisté à étudier deux enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes. Je présenterai dans un premier temps la caractérisation d'une nouvelle acyltransférase de tabac, l'**HydroxyCinnamoyl-CoenzymeA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT)**. Cette enzyme synthétise des intermédiaires métaboliques, des esters phénoliques d'acide quinique ou shikimique. J'ai montré que ces composés phénoliques sont notamment des précurseurs essentiels à la biosynthèse de la lignine, un des polymères majeur dérivant de ce métabolisme. Puis, dans un second temps, j'aborderai l'analyse de l'interaction entre une *O*-méthyltransférase, la **Caféoyl-CoenzymeA *O*-MéthylTransférase (CCoAOMT)**, avec son substrat, le caféoyl-CoA. Ces études nous ont permis de mieux comprendre au niveau structural la spécificité stricte de l'enzyme pour les esters de CoA.

L'introduction de ce mémoire va tout d'abord être consacrée à la présentation du **métabolisme des phénylpropanoïdes** à travers une description des principales enzymes de la voie, des modes de régulation et des nombreux composés dérivant de ce métabolisme. Dans une seconde partie, j'exposerai les principales caractéristiques des tissus conducteurs, leur lignification, les étapes enzymatiques conduisant à **la lignine** et les avancées essentielles qui ont été obtenues grâce à la modulation de la voie de biosynthèse par des approches de génie génétique. Enfin, le troisième et dernier volet de l'introduction décrira **la voie du shikimate**. Cette voie appartient au métabolisme primaire et fournit les acides aminés aromatiques, parmi lesquels le précurseur du métabolisme des phénylpropanoïdes, la phénylalanine. Des études récentes ont également mis en lumière l'importance d'intermédiaires métaboliques de la voie du shikimate dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

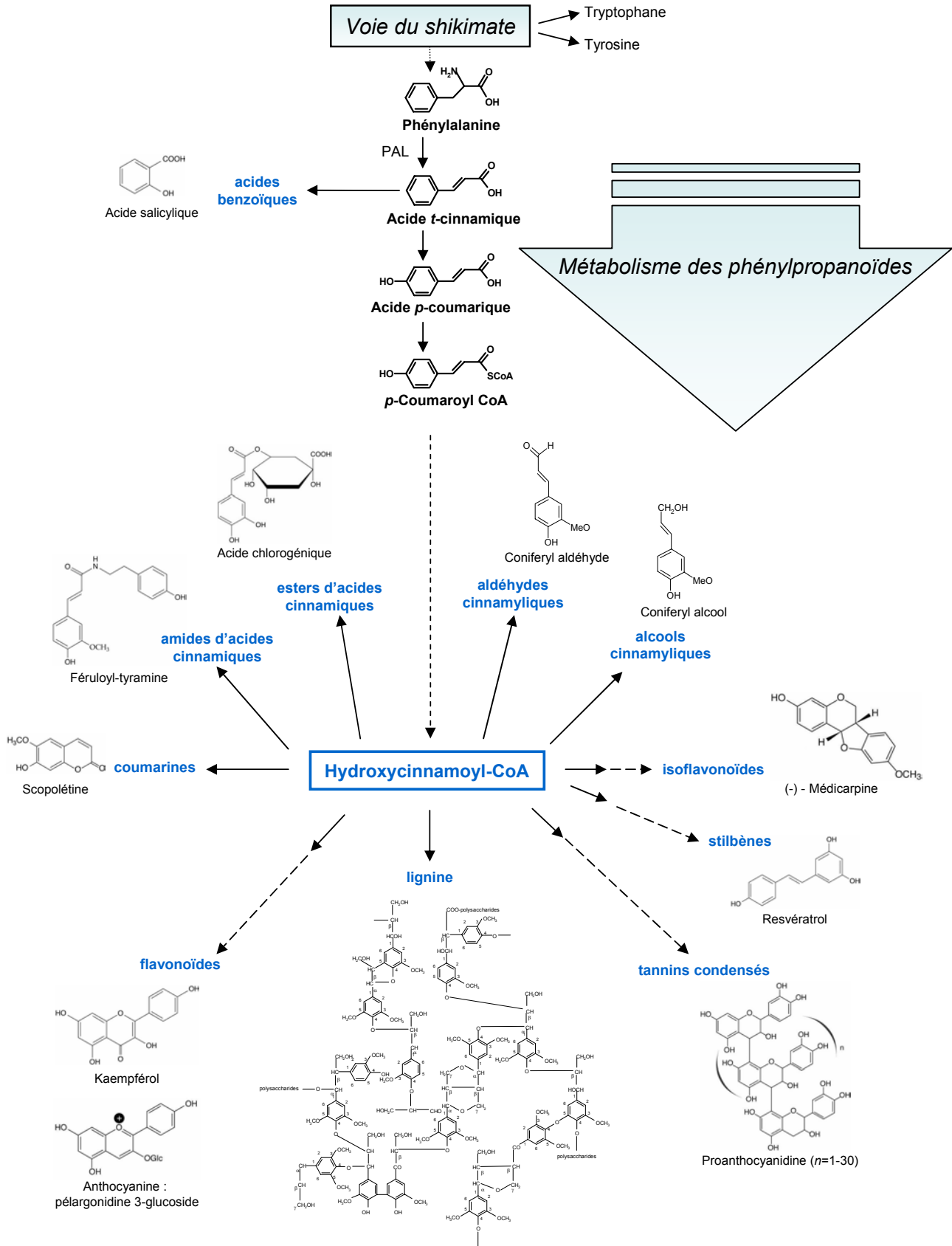
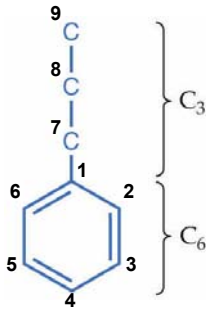


Figure 3. Quelques exemples de composés dérivant du métabolisme des phénylpropanoïdes. PAL, phénylalanine ammoniac lyase.

A



B

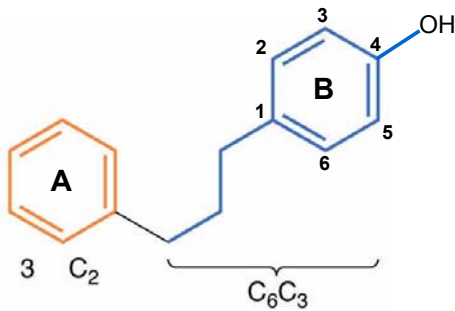


Figure 4. Squelettes carbonés des dérivés du métabolisme des phénylpropanoïdes.

A : Squelette phénylpropane : C₆ – C₃, dérivant du squelette carboné de la Phe, à l'origine des phénylpropanoïdes simples.

B : Squelette phénylpropane - acétate : C₆C₃– C₆, issu de la liaison entre un dérivé phénylpropane, le *p*-coumaroyl-CoA (bleu, **B**), et de la condensation de trois molécules de malonyl-CoA (noyau aromatique en rouge, **A**). Ces deux noyaux aromatiques sont à l'origine des phénylpropanoïdes « complexes ».

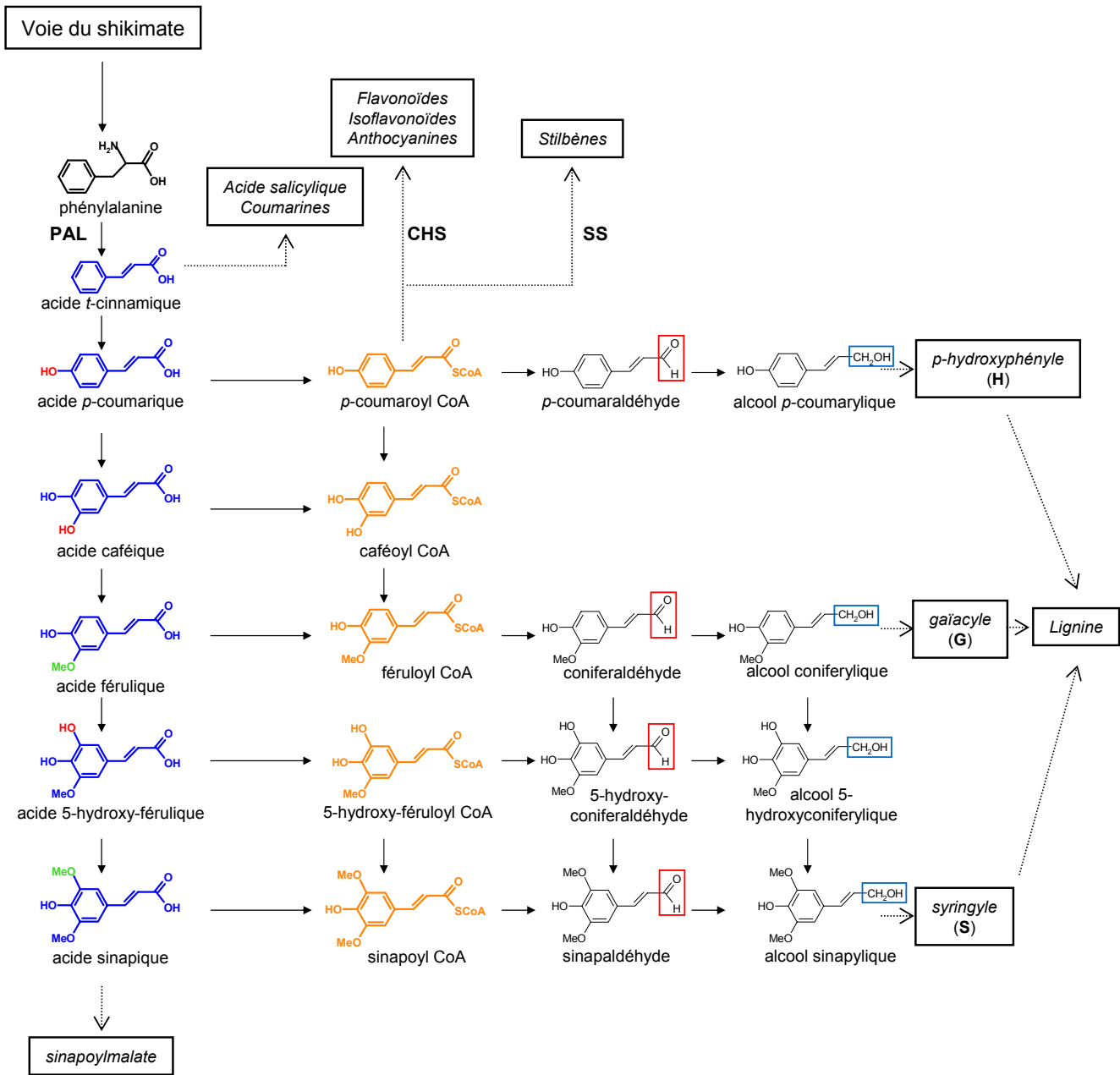


Figure 5. Représentation simplifiée du métabolisme des phénylpropanoïdes. Les principaux intermédiaires métaboliques sont présentés; les étapes enzymatiques seront décrites ultérieurement.

Le premier composé phénylpropane est l'acide *t*-cinnamique. Il va conduire à cinq autres **acides hydroxycinnamiques** (en bleu) qui diffèrent par leur degré d'**hydroxylation** (rouge) et de **méthoxylation** (vert). Les **esters de CoA** correspondants (en orange) représentent les intermédiaires activés du métabolisme des phénylpropanoïdes. Les fonctions carboxyles estérifiées peuvent subir deux étapes de réduction conduisant successivement aux fonctions aldéhydes (□) puis alcools (□). Trois de ces composés alcools constituent des précurseurs de la lignine, les unités *p*-hydroxyphényle (**H**), gaiacyl (**G**) et syringyl (**S**).

PAL, phénylalanine ammoniac lyase; CHS, chalcone synthase; SS, stilbène synthase.

1. Le métabolisme des phénylpropanoïdes

1.1 Rôle du métabolisme des phénylpropanoïdes chez les plantes

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est un métabolisme secondaire, spécifique du règne végétal. Il conduit, à partir de la phénylalanine (Phe), à la synthèse d'une multitude de composés dont la nature peut varier suivant les espèces végétales. L'ensemble des composés phénylpropanoïdes dérive de l'acide *t*-cinnamique, le premier phénylpropane formé à partir de la Phe grâce à l'action de la Phénylalanine Ammoniac Lyase (PAL) (**Fig. 3**). La PAL est l'enzyme constituant le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate, qui conduit aux acides aminés aromatiques, et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes (**Fig. 3**). Ces composés secondaires sont impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la pigmentation, la lignification, la protection contre des agents biotiques ou abiotiques, ou encore la signalisation (Hahlbrock et Scheel, 1989; Shirley, 1996; Weisshaar et Jenkins, 1998). Les dérivés phénylpropanes possèdent tous le même squelette carboné issu de la Phe : un noyau aromatique et une chaîne latérale de trois carbones (C₆-C₃) (**Fig. 4A**).

Les phénylpropanoïdes simples sont produits à partir de l'acide *t*-cinnamique par une succession d'étapes d'hydroxylation, de méthylation et de réduction (**Fig. 5**). Ces composés incluent les acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique (en bleu, **Fig. 5**), leurs dérivés et les coumarines simples telles que l'ombélliférone ou la scopolétine. Ces acides libres s'accumulent rarement à de fortes concentrations dans les cellules, mais sont généralement sous forme de conjugués. On trouve des esters de glucoses (glucosylation des précurseurs de la lignine), des esters d'acides organiques (des acides hydroxycinnamiques estérifiés aux acides quinique, shikimique ou malique), des composés estérifiés aux polysaccharides pariétaux (esters d'acide férulique) ou encore des polymères structuraux, formés à partir de la polymérisation de phénylpropanoïdes simples et déposés au niveau de la paroi cellulaire (lignine, subérine). La synthèse de la majorité de ces composés nécessite un apport énergétique. Au sein du métabolisme des phénylpropanoïdes les esters de coenzyme A (CoA) jouent ce rôle grâce à la liaison thiolester riche en énergie. Ainsi, les thiolesters d'acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique (en orange, **Fig. 5**) constituent des plaques tournantes vers des composés plus complexes (**Fig. 3**).

Un grand nombre de phénylpropanoïdes sont des dérivés d'un squelette carboné à 15 carbones (**Fig. 4B**) dont la synthèse débute par la condensation du *p*-coumaroyl-CoA et de trois molécules de malonyl-CoA. Cette réaction est catalysée par la chalcone synthase (CHS). Le produit de cette réaction va conduire à toute une panoplie de molécules aux propriétés anti-oxydantes (les flavonoïdes), anti-microbiennes (les isoflavonoïdes comme la médicarpine; **Fig. 3**) et toxiques pour les herbivores (les tannins condensés; **Fig. 3**). Ces produits interviennent dans de nombreux processus physiologiques tels que la pigmentation des fleurs ou des fruits

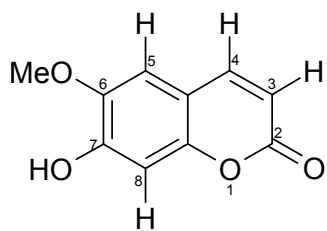


Figure 6. Structure de la scopolétine, une coumarine.

(anthocyanines; **Fig. 3**), les relations symbiotiques (flavonoïdes) ou la protection des tissus aux rayonnements U.V. (kaempférol; **Fig. 3**). Certaines espèces végétales codent également pour la stilbène synthase (SS) qui utilise les mêmes substrats que la CHS et conduit à la synthèse des stilbènes, des composés aux propriétés anti-oxydantes ou anti-microbiennes tels que le resvératrol (**Fig. 3**).

Une grande diversité caractérise ces phénylpropanoïdes spécifiques du règne végétal. Le squelette carboné subit, de manière régio-spécifique, des réactions d'hydroxylation, de méthylation, de glycosylation, d'acylation, de prénylation ou encore de sulfatation. Ces réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes spécialisées appartenant à des familles multigéniques telles que les mono-oxygénases à cytochrome P450, les méthyltransférases, les glucosyltransférases ou encore les acyltransférases. Cette variabilité structurale reflète la multitude des activités et des fonctions biologiques de ces composés. Ceci implique une régulation fine des étapes enzymatiques intervenant dans cette voie métabolique, que ce soit au cours du développement de la plante ou en réponse à divers stimuli environnementaux. La régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes et de la voie du shikimate est coordonnée, afin de mieux contrôler le flux de carbone injecté dans la voie des phénylpropanoïdes, par l'intermédiaire de la PAL (Douglas, 1996).

Les principaux dérivés phénylpropanes vont être présentés ainsi que les étapes enzymatiques de la voie générale puis celles qui vont conduire plus particulièrement à la synthèse de la lignine. Enfin, la stimulation du métabolisme des phénylpropanoïdes lors de divers stress et les mécanismes qui régulent cette voie seront détaillés.

1.2 Les produits dérivés du métabolisme des phénylpropanoïdes

1.2.1 Les coumarines

Ce sont des composés phénoliques cyclisés (**Fig. 6**) qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux (Brown, 1981). Cependant, leur voie de biosynthèse peut varier d'une espèce à l'autre. En effet, la scopolétine de tabac dérive de l'acide férulique (Fritig *et al.*, 1972), tandis que des expériences d'apport de précurseurs marqués semblent montrer que ce n'est pas le cas chez le tournesol (Hurtado-Cabello *et al.*, 1997). Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce (Brown, 1981). Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance des plantes. Certaines d'entre elles sont induites par des stress abiotiques et biotiques et possèdent une activité antimicrobienne telles les furanocoumarines de persil (Hahlbrock et

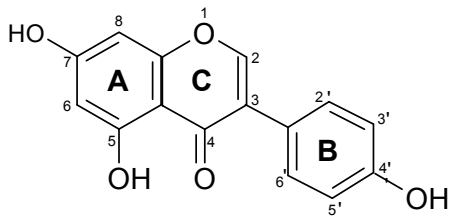


Figure 7. Structure de la génistéine, une isoflavone appartenant à la classe des isoflavonoïdes.

- A** : noyau aromatique issu de la condensation malonique.
- B** : noyau aromatique issu du dérivé phénylpropane.
- C** : hétérocycle.

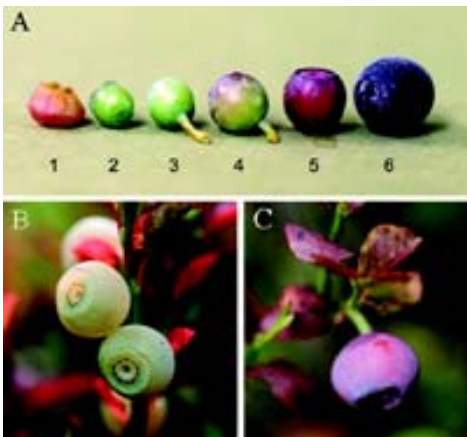


Figure 8. Rôle des anthocyanes dans la coloration des fleurs et des fruits.

- A** : Pigmentation de la fleur (1) et du fruit (2 à 6) de la myrtille au cours du développement.
- B** et **C** : coloration du fruit mature de deux mutants naturels affectés dans la voie de biosynthèse des anthocyanes. (Jaakola *et al.*, 2002).

Scheel, 1989). Elles sont considérées comme des phytoalexines. Celles-ci sont des molécules de faible masse moléculaire provenant de voies métaboliques variées comme celle des phénylpropanoïdes ou des sesquiterpènes. Les phytoalexines sont synthétisées au niveau des sites d'infection et ont une activité antimicrobienne démontrée *in vitro*.

1.2.2 Les stilbènes, les flavonoïdes et dérivés

Cette section regroupe les flavonoïdes, isoflavonoïdes, flavanones, anthocyanes, tannins et stilbènes, tous formés à partir du *p*-coumaroyl-CoA. Les flavonoïdes et leurs dérivés possèdent deux structures cycliques phénoliques (A et B) reliées par un hétérocycle (C) (**Fig. 4B et 7**). A l'exception des stilbènes, la première étape menant à ces composés est catalysée par la chalcone synthase (CHS) (**Fig. 3**) et conduit à la chalcone. Les stilbènes, quant à eux, sont synthétisés par la stilbène synthase (SS) (**Fig. 3**), une enzyme présentant des similarités avec la CHS (Shirley, 1996; Schröder et Schröder, 1990). Les flavonoïdes et dérivés sont stockés sous forme libre ou conjuguée mais leur localisation cellulaire est encore incertaine, bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole et/ou dans le réticulum endoplasmique (Dakora et Phillips, 1996). Ils protègent les tissus végétaux contre les rayonnements U.V. comme l'indique la sensibilité aux U.V. de mutants d'*Arabidopsis* et de maïs déficients en flavonoïdes (Shirley, 1996).

Les anthocyanes, une classe de flavonoïdes, sont des pigments non photosynthétiques responsables par exemple de la coloration des fleurs, des fruits (**Fig. 8**) et des graines (Dong *et al.*, 2001; Winkel-Shirley, 2002; Jaakola *et al.*, 2002). Leur synthèse est également activée lors de stress liés à la lumière ou aux températures extrêmes (Christie *et al.*, 1994).

Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes interviennent également comme signaux dans les interactions plante-microorganisme. Lors des réactions de défense, la synthèse *de novo* de flavonoïdes aux propriétés antifongiques est stimulée. Les stilbènes, comme le resvératrol (**Fig. 3**), sont également des phytoalexines de vigne et d'arachide. Au cours de la symbiose avec *Rhizobium*, les flavonoïdes interviennent notamment dans le chimiotactisme et la nodulation des légumineuses.

Enfin, des analyses de pollen mettent en cause des flavonoïdes dans la perte de fertilité de mutants de maïs et de pétunias transgéniques inhibés pour la CHS (Shirley, 1996).

1.2.3 Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques, dont l'acide chlorogénique

Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques constituent des composés importants dans la physiologie de la plante de par leur large distribution et de par leur rôle biologique. Ils sont impliqués dans les processus de lignification, la division cellulaire, la signalisation ou encore

Antioxidants	Sources	Antioxidant activity (mM)
Vitamins		
Vitamin C	Fruits and vegetables.	1.0
Vitamin E	Grains, nuts and oils	1.0
Flavonoids		
Anthocyanidins		
Oenin	Black grapes/Red wine	1.8
Cyanidin	Grapes, raspberries and strawberries	4.4
Delphinidin	Aubergine skin	4.4
Flavonols		
Quercetin	Onion, apple skin, berries, black grapes, tea and broccoli	4.7
Kaempferol	Endive, leek, broccoli, grapefruit and tea	1.3
Flavones		
Rutin	Onion, apple skin, berries, black grapes, tea and broccoli	2.4
Luteolin	Lemon, olive, celery and red pepper	2.1
Chrysin	Fruit skin	1.4
Apigenin	Celery and parsley	1.5
Hydroxycinnamates		
Caffeic acid	White grapes, olive, cabbage and asparagus	1.3
Chlorogenic acid	Apple, pear, cherry, tomato and peach	1.3
Ferulic acid	Grains, tomato, cabbage and asparagus	1.9
<i>p</i> -Coumaric acid	White grapes, tomato, cabbage and asparagus	2.2

Figure 9. Activités antioxydantes relatives de phénylpropanoïdes présents dans les aliments comparées à celles des vitamines C et E (Rice-Evans *et al.*, 1997). L'activité antioxydante est exprimée en concentration d'une solution de Trolox possédant la même activité antioxydante qu'une solution à 1 mM de la substance étudiée.

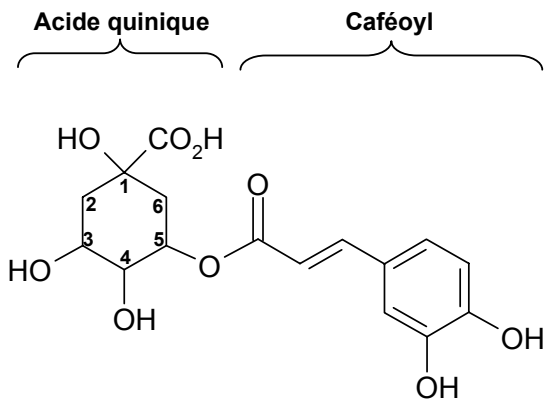


Figure 10. Acide chlorogénique : estérification de l'acide caféique en position 5 de l'acide quinique.

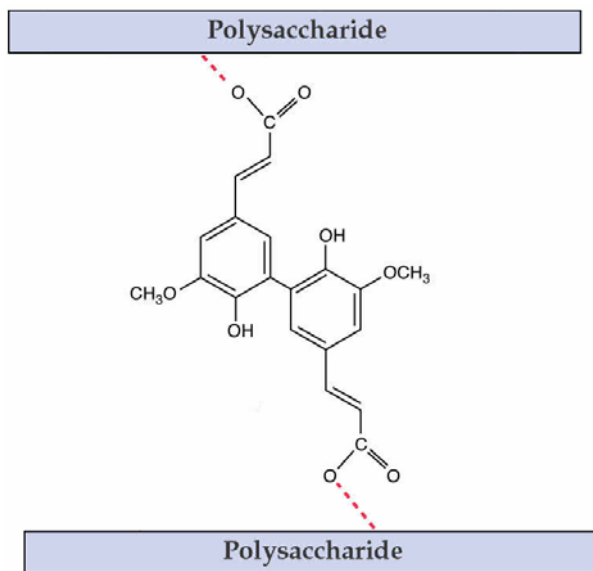
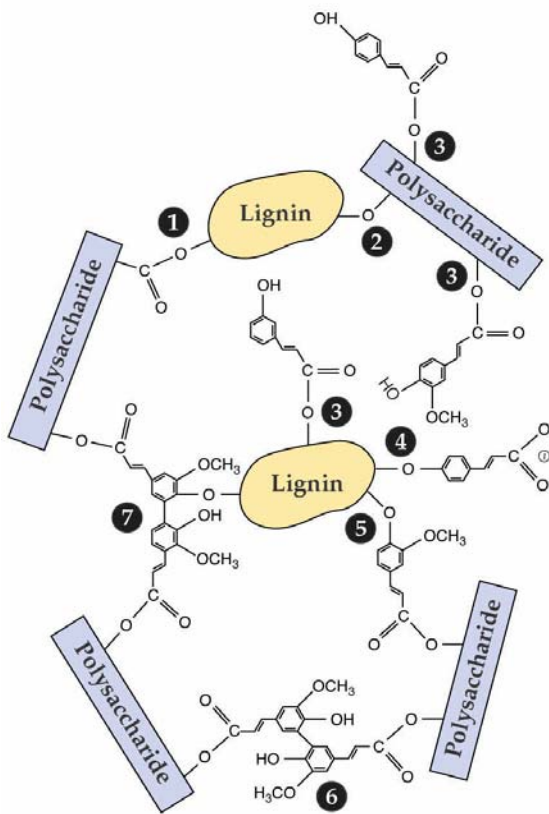


Figure 11. Structure d'un pontage d'acide diferulique entre des polysaccharides pariétaux par des liaisons esters. (Ishii *et al.*, 1997; Buchanan *et al.*, 2001).



- ① Direct ester linkage
- ② Direct ether linkage
- ③ Hydroxycinnamic acid ester
- ④ Hydroxycinnamic acid ether
- ⑤ Ferulic acid bridge
- ⑥ Dehydrodiferulic acid diester bridge
- ⑦ Dehydrodiferulic acid diester-ether bridge

Figure 12. Schéma des liaisons possibles entre les polysaccharides pariétaux et la lignine (pontage féruilique des polymères pariétaux spécifique des graminées). (Ishii *et al.*, 1997; Buchanan *et al.*, 2001).

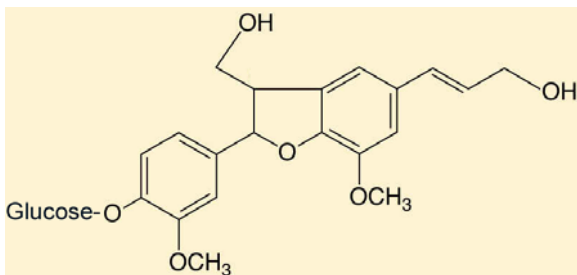


Figure 13. Déhydrodiconiféryl alcool glucoside (DCG). (Buchanan *et al.*, 2001).

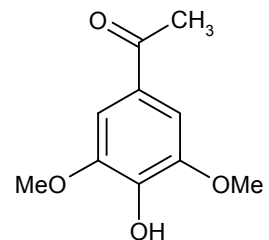


Figure 14. Acétosyringone.

les propriétés physico-chimiques des parois cellulaires végétales. Il a également été montré, *in vitro*, que les acides hydroxycinnamiques et leurs conjugués ont des pouvoirs antioxydants importants (**Fig. 9**). En effet, l'ingestion de ces molécules, à travers la consommation de café par exemple ou de fruits, semble constituer un moyen de lutte important contre les méfaits des radicaux libres sur notre santé (Kroon et Williamson, 1999). L'acide férulique estérifié aux parois cellulaires et l'acide caféique estérifié à l'acide quinique, appelé acide chlorogénique (CGA) (**Fig. 10**), constituent la majorité des acides hydroxycinnamiques présents dans notre alimentation. Les grands buveurs de café peuvent ingérer jusqu'à 2g de CGA par jour (Clifford, 1999).

Les esters de CoA semblent être la source principale des **acides hydroxycinnamiques estérifiés aux parois** (Meyer *et al.*, 1991). Dans les parois, les dérivés d'acides férulique et *p*-coumarique sont majoritairement recensés, parmi lesquels des dimères d'acide férulique. Ces phénols sont fixés covalamment aux polysaccharides des parois par des liaisons esters, par exemple à des arabinoxylanes ou des xyloglucanes (**Fig. 11**) (Iiyama *et al.*, 1994; Ishii, 1997). La féruloylation des polysaccharides peut se faire au niveau de la paroi par la voie oxydative mais pourrait également se dérouler dans les membranes Golgiennes grâce à une enzyme de type transférase. Dans la paroi, les polysaccharides peuvent ainsi être liés à la lignine via l'acide férulique et reliés entre eux grâce aux dimères d'acide férulique via des liaisons esters (**Fig. 12**). Ces liaisons spécifiques des parois secondaires permettraient de les rigidifier et d'assurer leur hydrophobicité. Il existe une corrélation entre l'accumulation d'acide férulique et de son dimère (acide déhydrodiférulique) et la diminution de l'expansion cellulaire chez les graminées (Iiyama *et al.*, 1994). D'autre part, les polysaccharides féruloylés pourraient servir de point d'ancrage à la lignification (Ishii, 1997). Par ailleurs, des dérivés d'acide férulique et *p*-coumarique s'accumulent fortement dans les tissus élicités ou infectés (Nicholson et Hammerschmidt, 1992). Leur rôle sera développé plus loin (paragraphe 1.5.2). Les acides hydroxycinnamiques et notamment l'acide férulique pourraient également être estérifiés aux protéines pariétales par l'intermédiaire des résidus tyrosine ou cystéine (Iiyama *et al.*, 1994).

Quant aux **dérivés d'acides hydroxycinnamiques solubles**, leur nature varie en fonction des espèces végétales et ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques. Par exemple, le glucoside d'alcool déhydrodiconiférylique (DCG), produit de la dimérisation de deux molécules d'alcool coniférylique suivie d'une glycosylation (**Fig. 13**) (Orr et Lynn, 1992), présente une activité semblable à celle des cytokinines sur la division cellulaire (Binns *et al.*, 1987; Teutonico *et al.*, 1991) et semble jouer un rôle important dans le développement de la plante (Tamagnone *et al.*, 1998b). L'implication de certains de ces dérivés dans les interactions plantes / microorganismes a également été démontrée. Des composés tels que l'acétosyringone (**Fig. 14**) induisent les gènes de virulence d'*Agrobacterium tumefaciens* (Stachel *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1995).

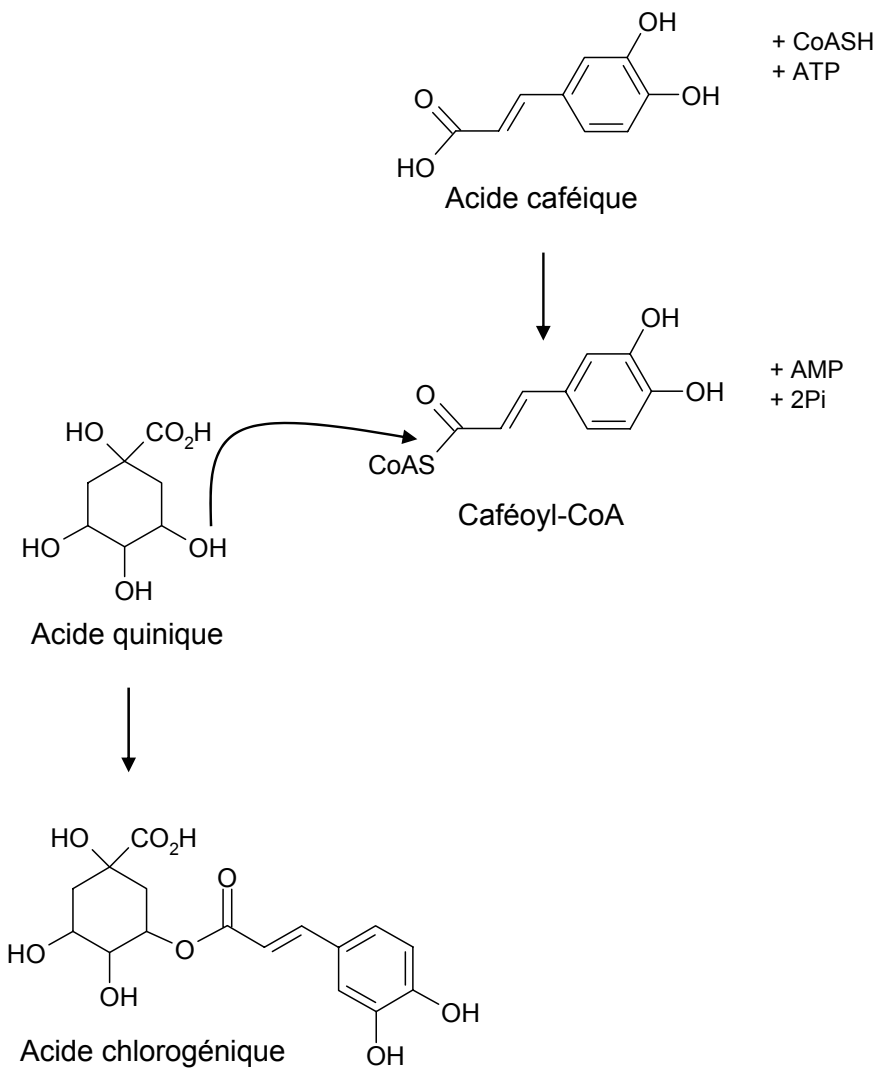


Figure 15. Mise en évidence de la synthèse de l'acide chlorogénique à partir d'acide caféique, de CoASH, d'ATP et d'acide quinique dans des suspensions cellulaires de *Nicotiana alata* (Stöckig et Zenk, 1974).

L'acide chlorogénique, ou acide 5-O-caféoyl quinique, ou CGA, est la forme combinée la plus répandue de l'acide caféique dans la nature. Trois autres isomères existent selon la fonction alcool estérifiée par l'acide caféique (**Fig. 10**). Le CGA a été découvert chez le café en 1897 par Gortner et représente l'un des composés phénoliques solubles les plus abondants dans les végétaux (Harborne, 1964). L'acide quinique est relié à la biosynthèse des dérivés d'acide shikimique (voir paragraphe 3.4), par conséquent il n'est pas surprenant de trouver des esters de l'acide shikimique chez certaines espèces (Harborne, 1964). L'acide caféique peut être associé avec d'autres acides organiques simples tels que l'acide tartrique, malique ou rosmarinique.

La synthèse du CGA représente un processus endo-énergétique qui requiert l'activation du groupement carboxyle du dérivé phénylpropane. En 1974, Stöckigt et Zenk pensaient que, parmi les intermédiaires riches en énergie du métabolisme des phénylpropanoïdes, les dérivés hydroxycinnamoyl-CoA étaient de bons candidats. En effet, il avait déjà été montré que ces esters de CoA intervenaient dans la biosynthèse des flavonoïdes. Ainsi, à partir d'extrait brut de suspensions cellulaires de *Nicotiana alata* et à l'aide de substrats marqués au C¹⁴ (exemple, l'acide caféique), Stöckigt et Zenk (1974) mettaient en évidence dans un premier temps la synthèse de caféoyl-CoA à partir de CoASH et d'ATP et dans un second temps le transfert de la partie caféoyl de ce thiol ester sur l'acide quinique pour former le CGA (**Fig. 15**). Ils montraient que le caféoyl-CoA était un intermédiaire indispensable à la réaction de synthèse du CGA (Stöckigt et Zenk, 1974). Ainsi, le CGA provient de l'estérification du caféoyl-CoA avec l'acide quinique mais pourrait également dériver du *p*-coumaroyl quinate qui serait ensuite hydroxylé (Hanson, 1966; Gross, 1981; Hahlbrock et Scheel, 1989).

Le rôle du CGA dans la plante n'est pas encore bien déterminé. Chez le tabac, c'est le composé phénolique soluble le plus abondant constituant un réservoir important de phénols. Le CGA pourrait être rapidement mobilisé pour conduire, à partir de l'acide caféique libéré, aux dérivés hydroxycinnamiques notamment lors de la blessure (Maher *et al.*, 1994). Lors de la réaction d'hypersensibilité (RH) de *Nicotiana tabacum*, induite par le VMT, de nombreux composés phénoliques s'accumulent à proximité du site d'infection. Parmi ces molécules, on retrouve les différentes isoformes de CGA et des esters quiniques d'acide férulique et d'acide *p*-coumarique (Legrand *et al.*, 1971; Tanguy et Martin, 1972). La synthèse de ces esters semble être spécifique des mécanismes de résistance puisqu'un transfert thermique des plantes, inhibant la RH, conduit à une disparition de ces phénomènes d'induction. Le rôle exact de ces composés dans la résistance des plantes n'a pas encore été déterminé. Ils pourraient intervenir dans la protection contre les rayons U.V. (Shirley, 1996; Grace et Logan, 2000) et dans la gestion du stress oxydatif provoqué par l'élicitation (Rice-Evans *et al.*, 1997). L'origine de l'acide quinique sera détaillée dans la partie de l'introduction consacrée à la voie du shikimate (paragraphe 3.4).

L'acide salicylique (SA), dont l'implication dans les réponses de défense en tant que molécule signal a été démontrée, semble également dériver de ce métabolisme. Sa biosynthèse ferait intervenir des intermédiaires tels les acides cinnamique et benzoïque dans de nombreuses

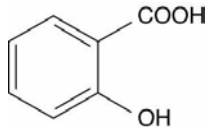


Figure 16. Acide salicylique.

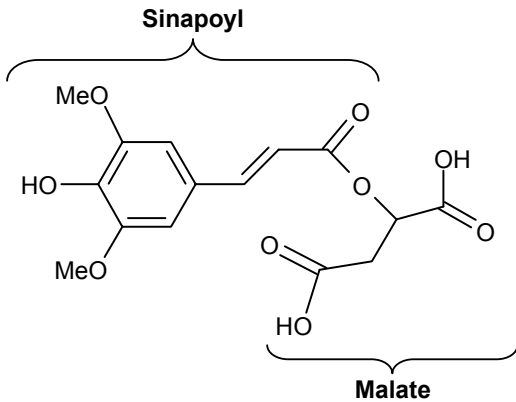


Figure 17. Sinapoylmalate.

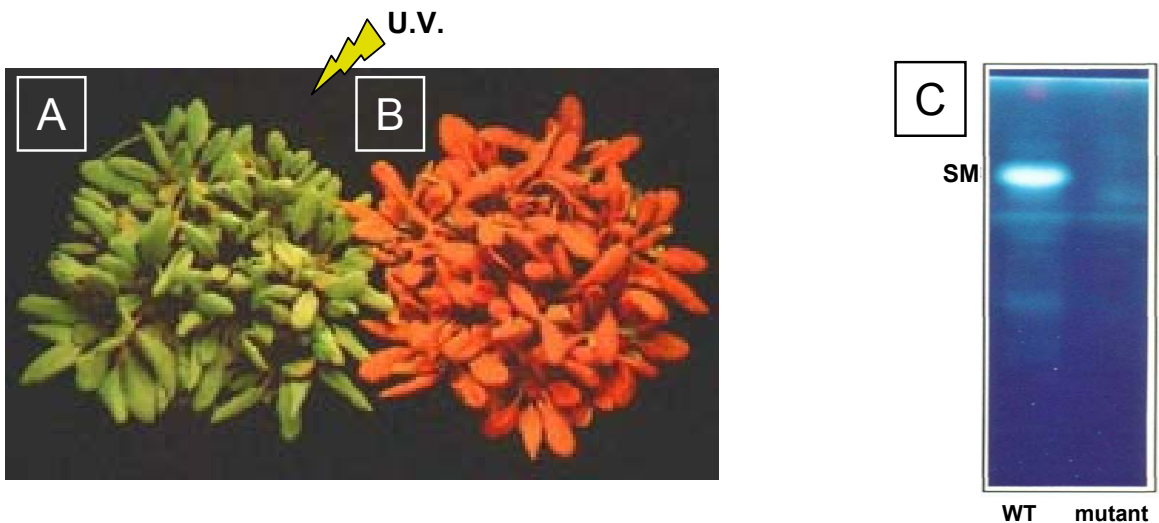


Figure 18. Ecotype Columbia d'*Arabidopsis* sauvage et mutant affecté dans le métabolisme des phénylpropanoïdes (Chapple *et al.*, 1992).

A : Plantules sauvages d'*Arabidopsis* : accumulation de sinapoylmalate dans les feuilles, conférant une coloration verte sous U.V.

B : Mutant d'*Arabidopsis*, affecté dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes et n'accumulant plus de sinapoylmalate; apparition de la fluorescence rouge conférée par la chlorophylle.

C : Analyse par CCM des composés phénoliques présents dans les feuilles de plantes sauvages (WT) ou mutées. SM, sinapoylmalate.

espèces (**Fig. 3 et 16**) (Meulwy *et al.*, 1995; Coquoz *et al.*, 1998; Pierrel, 1999; Chong *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002). Mais les étapes enzymatiques intervenant dans la voie de biosynthèse de l'acide salicylique à partir des intermédiaires phénoliques ne sont pas bien caractérisées. Il existe chez les bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* une autre voie biosynthétique de l'acide salicylique bien caractérisée faisant intervenir l'isochorismate synthase (Serino *et al.*, 1995). Récemment, il a été montré chez *Arabidopsis* que cette voie biosynthétique est également fonctionnelle chez les plantes à partir d'un intermédiaire du métabolisme primaire du shikimate, le chorismate (Wildermuth *et al.*, 2001).

Les esters d'acide sinapique jouent également un rôle physiologique important chez certaines espèces végétales. En effet, certains écotypes d'*Arabidopsis* (exemple : Columbia) accumulent plus que d'autres des quantités importantes de sinapoylmalate (**Fig. 17**) dans l'épiderme de leur feuille. Cette accumulation confère à ces tissus une coloration verte sous lumière U.V. (**Fig. 18A**) (Chapple *et al.*, 1992). Des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (exemple, le mutant *f5h*) ne synthétisent plus de sinapoylmalate (**Fig 18C**), la fluorescence verte disparaissant au profit de la fluorescence rouge de la chlorophylle (**Fig. 18B**). Les plantules présentent une sensibilité accrue aux rayons U.V. mettant en évidence le rôle de ces composés dans la protection des tissus aux rayonnements U.V. (Chapple *et al.*, 1992; Dixon et Paiva, 1995). Le phénotype « absence de fluorescence verte » sous lumière U.V. constituera, pour le groupe dirigé par C. Chapple, une technique de criblage d'une banque de mutants d'*Arabidopsis* en vue d'isoler des plantes affectées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes (voir paragraphes 2.5.3 et 2.5.6).

1.2.4 La subérine

La subérine est constituée de deux matrices de nature chimique différente mais en quantités similaires. L'une est formée d'acides gras constituant le domaine poly-aliphatique et la deuxième de dérivés phénylpropanes correspondant au domaine poly-phénolique (Boudet *et al.*, 1995; Bernards *et al.*, 1995). L'apport de phénylalanine marquée couplée à une analyse RMN montre que les composés phénoliques sont des dérivés d'acides hydroxycinnamiques (Bernards *et al.*, 1995). La subérine apparaît principalement dans l'écorce à la surface de la tige de beaucoup de plantes et à la surface de tissus souterrains tels que ceux des tubercules de pomme de terre. Elle joue un rôle important dans l'imperméabilité de ces tissus et dans le transport apoplastique de l'eau. Elle constitue également une barrière pré-formée contre les agents pathogènes et sa synthèse est fortement induite dans le tubercule de pomme de terre après blessure (Bernards et Razem, 2001).

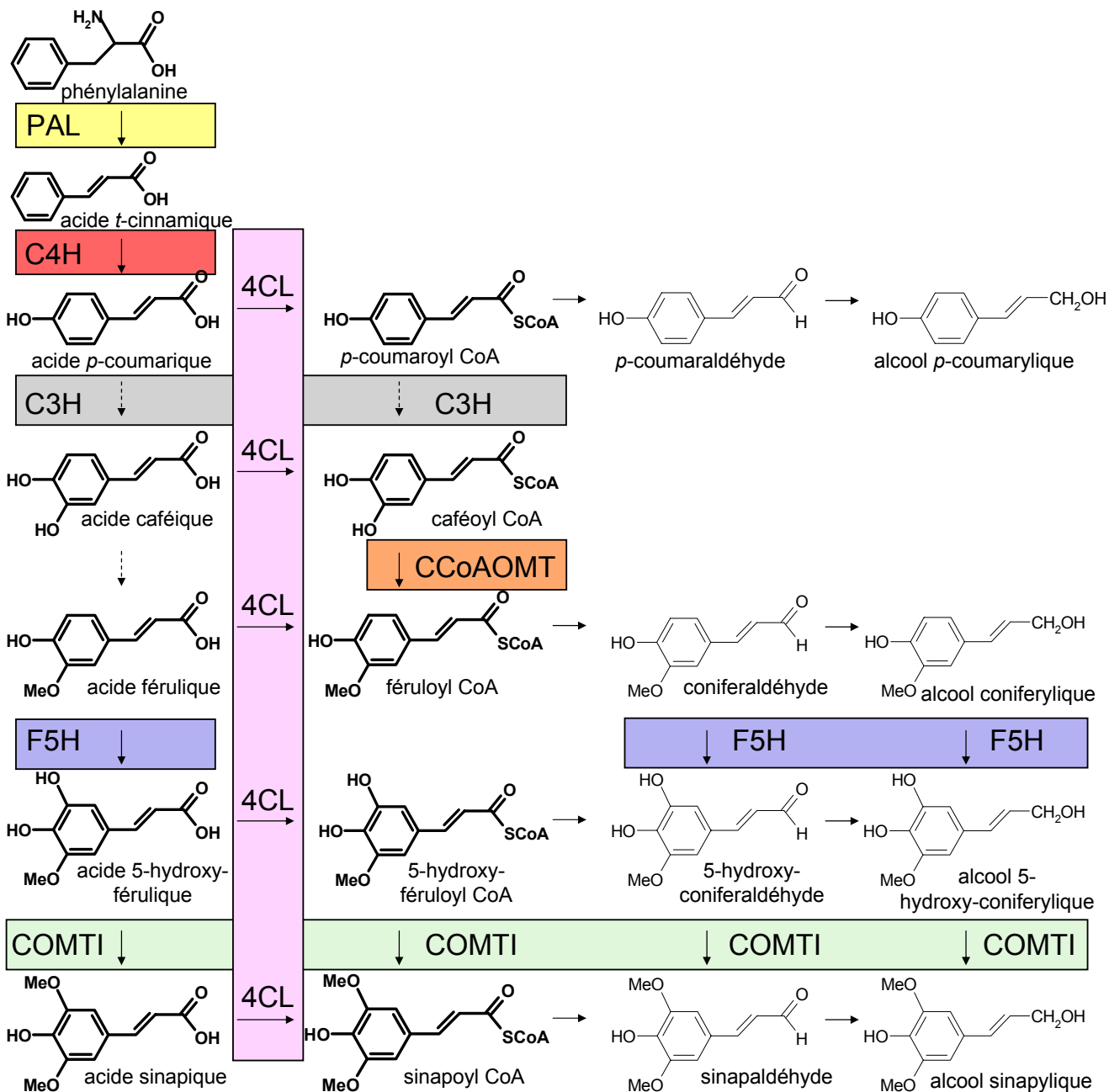


Figure 19. Position des enzymes de la voie principale du métabolisme des phénylpropanoïdes.

PAL, phénylalanine ammoniac lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase; CCoAOMT, caféoyl-CoA O-méthyltransférase; COMTI, caféate O-méthyltransférase de classe I; F5H, férulate 5-hydroxylase; 4CL, coumarate CoA ligase.

1.2.5 La lignine

La lignine est un polymère très complexe que l'on retrouve dans toutes les plantes vasculaires (Ptéridophytes, Angiospermes et Gymnospermes). Elle assure rigidité aux parois cellulaires végétales et imperméabilité aux tissus conducteurs. Ce polymère tridimensionnel est synthétisé au niveau de la paroi. Il résulte de la polymérisation oxydative, par des liaisons diverses, de trois unités monomériques ou monolignols : les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique (**Fig. 5**). Le paragraphe 2. de l'introduction est consacré entièrement à la lignine et à la voie de biosynthèse conduisant à ce biopolymère.

1.3 Les enzymes de la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes

Les enzymes de la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes conduisent, après désamination de la phénylalanine (Phe) par la PAL, à l'ensemble des acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés, notamment aux esters de CoA, grâce à la coumarate CoA ligase (4CL). Ces différents composés diffèrent par leur degré d'hydroxylation et de méthoxylation. Les groupements hydroxyles sont introduits par trois mono-oxygénases à cytochrome P450 : la cinnamate 4-hydroxylase (C4H), la *p*-coumarate 3-hydroxylase (C3H) et la férulate 5-hydroxylase (F5H). La méthylation des groupements phénoliques est catalysée soit par la caféoyl-CoA *O*-méthyltransférase (CCoAOMT) soit par la caféate *O*-méthyltransférase de classe I (COMTI). Ces réactions enzymatiques sont présentées **Fig. 19**, où la position théorique de chacune de ces enzymes est matérialisée par un code couleur.

1.3.1 La phénylalanine ammoniac lyase (PAL)

Elle catalyse la première étape de ce métabolisme, à savoir la désamination non oxydative de la Phe en acide *t*-cinnamique (**Fig. 20**, au verso), un précurseur de la voie de l'acide salicylique (Yalpani *et al.*, 1993). La PAL est décrite comme un tétramère dont les sous-unités sont codées par des familles multigéniques (de 2 à 40 gènes). Les gènes *PAL* ont été clonés chez un grand nombre d'espèces végétales incluant les Gymnospermes, les Monocotylédones et les Dicotylédones (Baucher *et al.*, 1998; Kumar et Ellis, 2001). L'activité PAL a également été caractérisée chez les champignons (Nambudiri *et al.*, 1970; Kim *et al.*, 2001). Cependant, une activité TAL ou tyrosine ammoniac lyase a été découverte chez les graminées. Chez le maïs, il a été montré *in vitro* que la PAL possédait une activité TAL (Rösler *et al.*, 1997; Whetten *et al.*, 1998). Cette réaction de désamination de la tyrosine permettrait d'aboutir directement à l'acide *p*-coumarique sans passer par l'acide *t*-cinnamique (**Fig. 20**, au verso). Mais il n'est pas clair si les voies de la PAL et de la TAL coexistent *in vivo*.

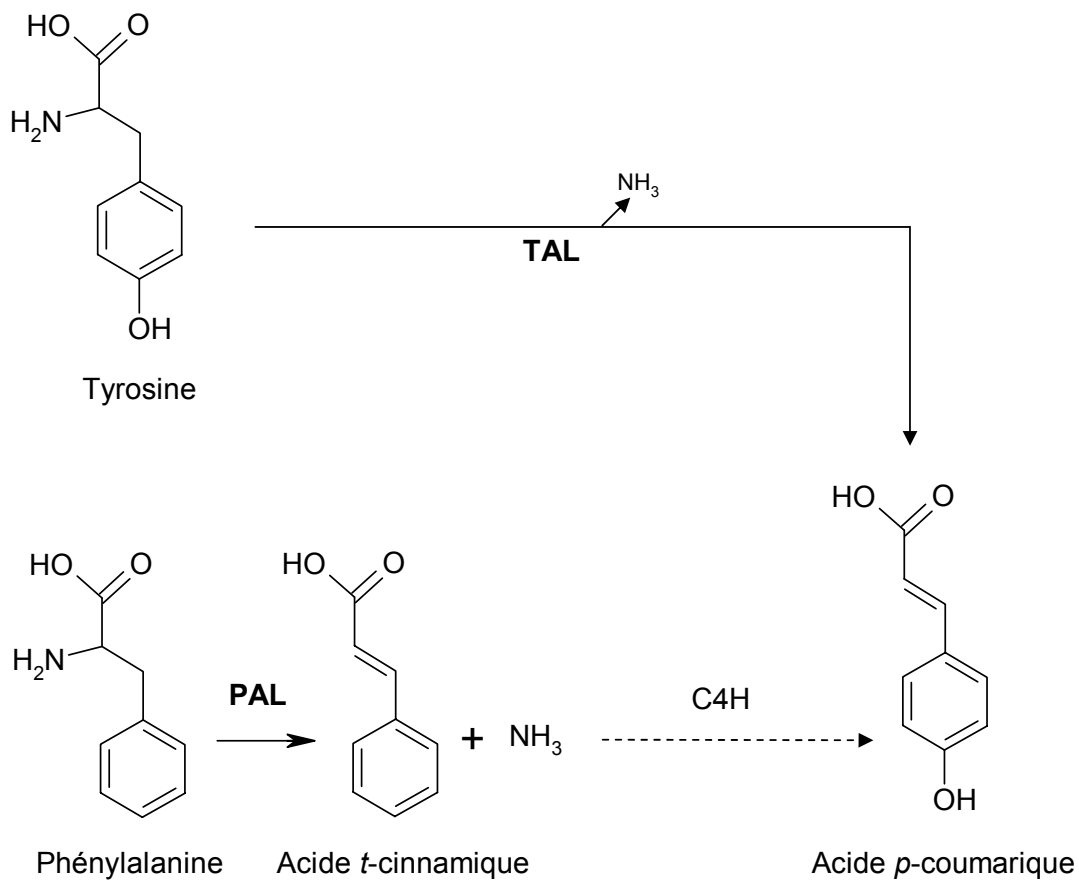


Figure 20. Réaction de désamination catalysée par la phénylalanine ammoniac lyase (**PAL**) et la tyrosine ammoniac lyase (**TAL**). C4H, cinnamate 4-hydroxylase.

Les gènes de *PAL* d'un même organisme sont régulés différemment et peuvent être induits suite à des stimuli variés tels que la lumière, l'éthylène, le froid, les rayonnements U.V., la blessure, l'infection par un agent pathogène (Boudet *et al.*, 1995; Baucher *et al.*, 1998; Rizhsky *et al.*, 2002). Ainsi, Liang et Coll. (1989a) ont montré que les isoformes de la PAL codées par des gènes différents chez le haricot sont exprimées de façon différentielle au cours du développement de la plante et en réponse à différents stimuli environnementaux. Plus récemment, deux gènes codant pour des PAL ont été clonés chez le peuplier. L'expression d'une des isoformes est corrélée avec l'accumulation des tannins condensés, alors que la seconde isoforme est essentiellement détectée au niveau des tissus lignifiés (Kao *et al.*, 2002). Chez la framboise, la couleur du fruit et les senteurs sont fortement reliées à l'accumulation de produits dérivants du métabolisme des phénylpropanoïdes. Une famille de deux gènes, codant pour la PAL et présentant des profils d'expression distincts au cours du développement végétatif et floral, a été caractérisée (Kumar et Ellis, 2001). Des études d'expression du promoteur du gène *PAL2* de haricot ont montré qu'il s'exprime spécifiquement dans le xylème, la fleur, les racines et les cellules blessées synthétisant des phénylpropanoïdes (Liang *et al.*, 1989b; Bevan *et al.*, 1989). La présence de l'activité PAL et l'immunolocalisation de la protéine ont été corrélées avec les processus de lignification et de différenciation du xylème (Osakabe *et al.*, 1996). Le rôle de la PAL dans les processus de lignification sera abordé dans le paragraphe 2.5.1.

Son implication au cours des réponses de défense a été démontrée en réduisant son expression par l'emploi d'inhibiteurs ou par manipulation génétique. Après infection par le Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT) de tabacs traités avec un inhibiteur de la PAL, la taille des lésions nécrotiques est supérieure à celle des témoins non traités, ce qui démontre une diminution importante de la résistance de la plante (Massala *et al.*, 1987). Des études d'hybridation *in situ* ARN-ARN ont également montré que les transcripts de la PAL s'accumulaient dans des tissus foliaires bordant les lésions (Pellegrini *et al.*, 1994).

La localisation subcellulaire de la PAL a également fait l'objet d'études. Les approches immunologiques ont notamment permis d'associer la PAL à des structures membranaires, dont la membrane plasmique et celle des vésicules Golgiennes, et à la paroi secondaire (Davin et Lewis, 1991; Nakashima *et al.*, 1997).

Comme nous venons de le voir, l'expression de la PAL est stimulée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. Il a été montré que la régulation de l'expression de cette protéine met en jeu de nombreux mécanismes de contrôle que ce soit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (voir paragraphe 1.6).

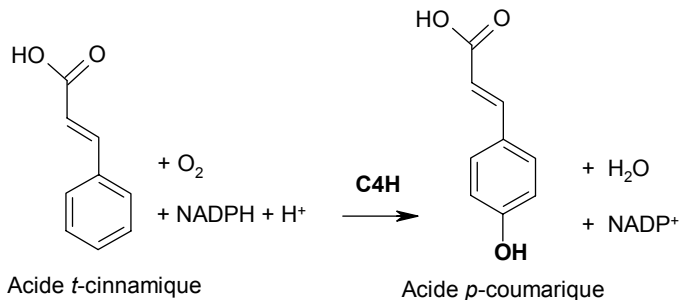


Figure 21. Réaction catalysée par la **C4H**, cinnamate 4-hydroxylase : hydroxylation en position 4 du noyau aromatique.

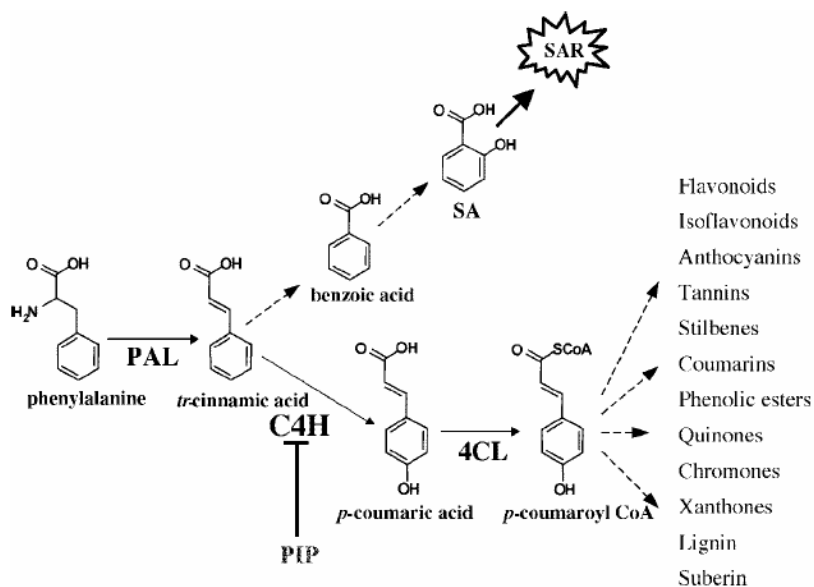
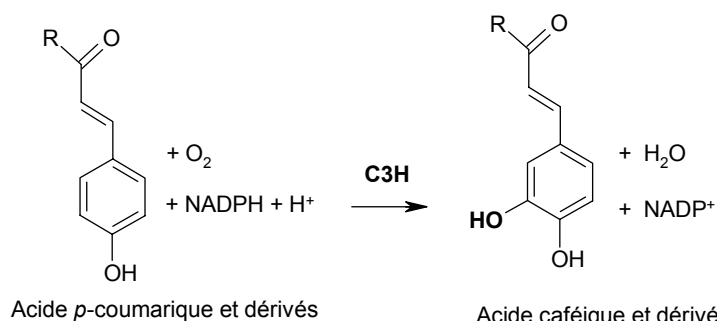


Figure 22. Inhibition de la **C4H** par le **PIP**, acide pipéronylique, en vue de rediriger le pool d'acide *t*-cinnamique vers la synthèse de l'acide salicylique (SA). (Schoch *et al.*, 2002).



R = OH ; acide *p*-coumarique
R = CoA ; *p*-coumaroyl-CoA
R = shikimate ; *p*-coumaroyl-shikimate

R = OH ; acide caféique
R = CoA ; caféoyl-CoA
R = shikimate ; caféoyl-shikimate

Figure 23. Réaction catalysée par la **C3H**, acide *p*-coumarique 3-hydroxylase : hydroxylation en position 3 du noyau aromatique. Le meilleur substrat et le produit correspondant sont soulignés.

1.3.2 La cinnamate 4-hydroxylase (C4H)

Cette enzyme hydroxyle en position 4 l'acide *t*-cinnamique en acide *p*-coumarique (**Fig. 21**). C'est une mono-oxygénase à cytochrome P450 appartenant à la sous famille CYP73 (Teutsch *et al.*, 1993). Comme beaucoup de mono-oxygénases à P450 de plantes, c'est une enzyme microsomale (Pierrel *et al.*, 1994; Ro *et al.*, 2001). La co-expression, dans la levure, de la C4H et d'une réductase de cytochrome P450-NADPH dépendante permet d'augmenter jusqu'à dix fois l'activité du cytochrome P450 (Ro *et al.*, 2002). L'expression de l'enzyme de topinambour dans la levure démontre la spécificité de substrat de la C4H pour l'acide *t*-cinnamique (Pierrel *et al.*, 1994). L'ADNc correspondant a été cloné dans de nombreuses espèces (Schuler, 1996) et les études d'expression révèlent que la C4H s'exprime dans des tissus variés, tels la racine, la tige, la fleur et lors de stress comme la blessure, l'exposition aux U.V. ou encore l'élicitation. Ces profils d'expression, souvent comparables à ceux de la PAL ou de la 4CL, suggèrent que la C4H est impliquée dans la lignification mais aussi dans les défenses de la plante (Bell-Lelong *et al.*, 1997; Mizutani *et al.*, 1997; Baucher *et al.*, 1998; Koopmann *et al.*, 1999; Ro *et al.*, 2001).

Une approche pharmacologique a permis d'inhiber spécifiquement l'activité C4H dans des cultures cellulaires de tabac provoquant une accumulation du substrat, l'acide *t*-cinnamique (Schoch *et al.*, 2002). Or, chez le tabac, l'acide *t*-cinnamique semble être le précurseur de l'acide salicylique (SA), une molécule signal essentielle à la mise en place des mécanismes de résistance. Lorsque ces cultures cellulaires de tabac sont co-traitées avec une molécule inhibitrice de la C4H et un éliciteur fongique, ce traitement a pour effet de conduire à une augmentation importante de l'acide salicylique (**Fig. 22**) (Chong *et al.*, 2001). Cette approche pourrait faciliter l'étude de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique.

1.3.3 La *p*-coumarate 3-hydroxylase (C3H)

La C3H réalise l'étape d'hydroxylation en position 3 du noyau aromatique (**Fig. 23**). Il y a encore peu de temps, elle était l'enzyme la moins bien caractérisée du métabolisme des phénylpropanoïdes puisqu'elle n'avait encore jamais été clonée. Son activité avait été caractérisée dans des extraits bruts de suspensions cellulaires de persil. Elle avait été détectée avec l'acide *p*-coumarique et son ester de CoA (Kneusel *et al.*, 1989). De même, Ye et Coll. (1994) avaient mis en évidence une activité C3H dans les racines et les trachéides de mésophylle de *Zinnia*, suggérant l'implication de cette enzyme dans la lignification. Mais les activités spécifiques mesurées étaient faibles vis-à-vis de ces substrats.

Récemment, le gène codant pour la C3H a été cloné chez *Arabidopsis*, de façon indépendante, par deux groupes de recherche différents. Par une approche de génomique fonctionnelle, Schoch et Coll. (2001) ont identifié et cloné une mono-oxygénase à cytochrome

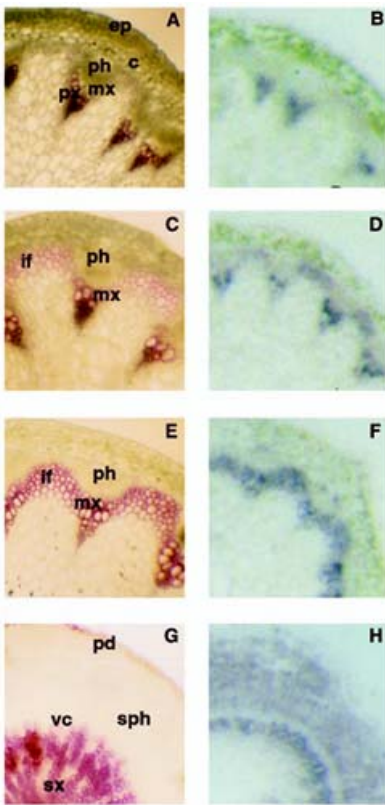


Figure 24. Immunolocalisation de la protéine C3H sur des coupes transversales de tige (le long de l'hampe florale) et de racine d'*Arabidopsis*. (Schoch *et al.*, 2001).

A, C, E et G : traitement des coupes avec du phloroglucinol colorant la lignine en rouge.

B, D, F et H : expérience d'immuno-empreinte avec des Ac anti-C3H; la coloration bleue indique l'expression de la protéine.

A, B : section de tige à proximité des bourgeons floraux.

C, D : section de tige à une hauteur intermédiaire.

E, F : section de tige à proximité de la rosette.

G, H : section de racine.

Ep, épiderme ; c, cortex ; px, protoxylème ; mx, métaxylème ; ph, phloème ; if, région interfasciculaire ; sx, xylème secondaire ; vc, cambium vasculaire ; sph, phloème secondaire ; pd, périderme.

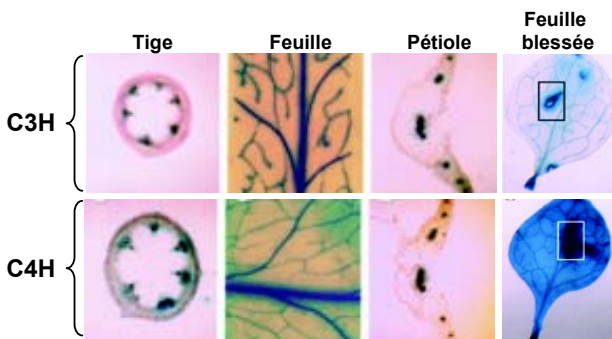


Figure 25. Localisation de l'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle des promoteurs de C3H ou de C4H dans différents tissus de plantes d'*Arabidopsis* transgéniques. On observe une régulation comparable de l'expression des deux gènes. L'activité GUS est révélée au niveau des tissus conducteurs de la tige, des feuilles et du pétiole. La blessure (encart) stimule l'expression du gène rapporteur sous le contrôle des deux promoteurs (Nair *et al.*, 2002).

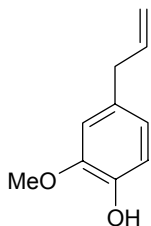


Figure 26. Eugénol

P450 appartenant à la sous famille CYP98, la CYP98A3. Cette enzyme possède une activité d'hydroxylation en position 3. Mais les études de spécificité de substrat (*in vitro*) ont montré que cette enzyme se montrait peu efficace aussi bien vis-à-vis de l'acide *p*-coumarique que du *p*-coumaroyl-CoA. Par contre, les esters quiniques ou shikimiques d'acide *p*-coumarique, des métabolites identifiés chez de nombreuses espèces végétales, se sont avérés être d'excellents substrats. Les ARNm de la C3H s'accumulent fortement au niveau de la hampe florale mais également dans les racines et les tissus de feuilles blessées. La technique d'immuno-empreinte, qui consiste à réaliser une empreinte d'une coupe transversale de tissu (de tige par exemple) sur une membrane de nitrocellulose puis d'effectuer une révélation à l'aide d'Ac-anti CYP98A3, a permis de détecter une forte expression de la protéine au niveau des tissus lignifiés de la hampe florale et des racines (**Fig. 24**). Parallèlement à ces études, Franke et Coll. (2002a) ont isolé le mutant *reduced epidermal fluorescence 8 (ref8)* qui présente une réduction de la fluorescence bleue-verte de l'épiderme foliaire sous lumière U.V. (**Fig. 17 et 18**). Par clonage positionnel, le gène *REF8* a été identifié comme étant le cytochrome P450 CYP98A3, préalablement caractérisé par Schoch et Coll. (2001). Le mutant *ref8* est mâle stérile et présente une réduction importante de taille. Les effets sur la biosynthèse de la lignine seront présentés dans le paragraphe 2.5.3.

Des études d'expression du gène rapporteur GUS, sous le contrôle du promoteur de la *C3H* ou de la *C4H*, ont permis de comparer l'expression spatio-temporelle des deux cytochromes P450. Les deux promoteurs présentent une inductibilité à la blessure et une régulation comparables au cours du développement de la plante et notamment une forte expression au niveau des tissus lignifiés (**Fig. 25**) (Nair *et al.*, 2002).

Deux ADNc codant pour des cytochromes P450 et présentant une forte similarité de séquence (90%) avec le gène d'*Arabidopsis* CYP98A3 ont été isolés chez le basilic (Gang *et al.*, 2002a). Comme pour l'enzyme d'*Arabidopsis*, les deux protéines identifiées présentent une forte affinité pour le *p*-coumaroyl shikimate. Ces réactions d'hydroxylation en position *meta* interviendraient dans la production, au niveau des trichomes, de composés dérivant du métabolisme des phénylpropanoïdes (exemple : l'eugénol, **Fig. 26**).

1.3.4 Les *O*-méthyltransférases (OMTs)

La réaction d'*O*-méthylation est un processus commun aux bactéries, champignons, plantes et mammifères. Les *O*-méthyltransférases jouent par ailleurs des rôles très variés. Chez les animaux, elles occupent une place importante dans le système nerveux central puisqu'elles participent notamment à la biosynthèse de la dopamine, un neurotransmetteur de type catécholamine et interviennent également dans la biosynthèse d'une hormone, la mélatonine (voir chapitre II, Fig. II 6) (Vidgren *et al.*, 1994; Ibrahim, 1997).

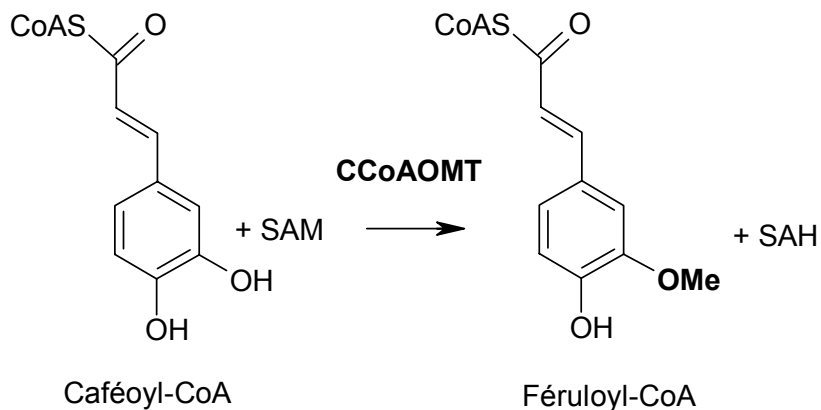


Figure 27. Réaction catalysée par la **CCoAOMT**, caféoyl-CoA O-méthyltransférase : méthylation de la fonction hydroxyle en position 3 du noyau aromatique.

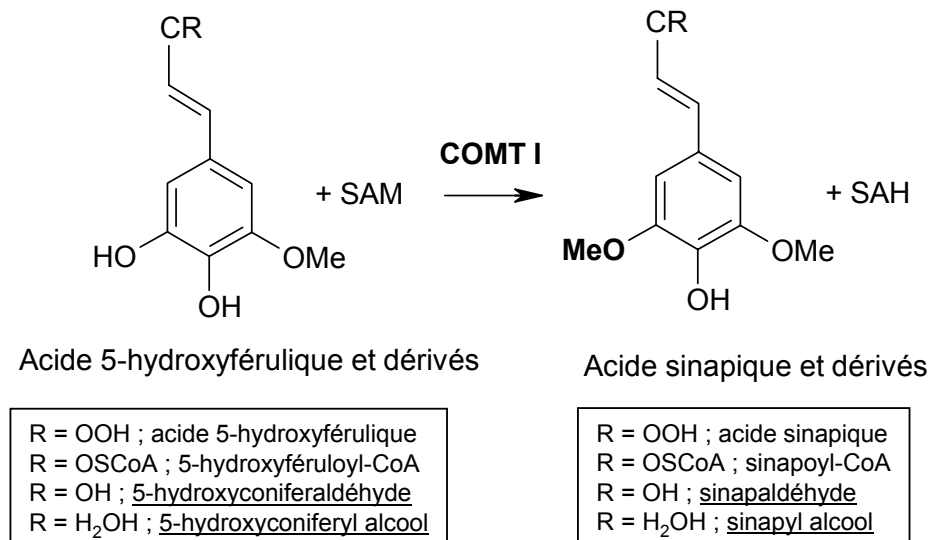


Figure 28. Réaction catalysée par la **COMT I**, caféate O-méthyltransférase : méthylation de la fonction hydroxyle en position 5 du noyau aromatique. Les meilleurs substrats et les produits correspondants sont soulignés.

Chez les plantes, les OMTs sont impliquées dans de nombreux métabolismes secondaires et également dans des processus variés tels la lignification, la croissance des plantes, la pigmentation de certains tissus ou encore la résistance aux agents pathogènes. Elles utilisent toutes la S-adénosyl L-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle. La classification et la nomenclature des OMTs végétales diffèrent selon que les auteurs considèrent les homologies de séquence entre les enzymes ou le type de substrat qu'elles utilisent. Cette partie sera détaillée dans le deuxième chapitre de ma thèse. Dans les deux paragraphes qui vont suivre, je vais présenter deux *O*-méthyltransférases impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes et plus précisément dans la méthylation des dérivés d'acides hydroxycinnamiques (HCAs). La caféoyl-CoA *O*-méthyltransférase (CCoAOMT) et l'acide caféique *O*-méthyltransférase (COMT) sont responsables de l'introduction des deux groupements méthyles, respectivement en position 3 et 5 du noyau aromatique (**Fig. 27 et 28**). Ces composés monométhoxylés et diméthoxylés vont constituer, chez les Angiospermes, les unités monomériques (ou monolignols) de la lignine (**Fig. 5 et 19**).

1.3.4.1 Les caféoyl-CoA OMTs (CCoAOMTs)

Elles catalysent la méthylation du caféoyl-CoA en féruloyl-CoA (**Fig. 27**). L'activité CCoAOMT a tout d'abord été caractérisée dans des suspensions cellulaires élicitées ou non de carotte (Kühnl *et al.*, 1989) et de persil (Pakusch *et al.*, 1989; Grimmig *et al.* 1999). Dans les deux cas, l'activité est stimulée après traitement des cellules avec un éliciteur provenant de *Phytophthora megasperma*, cette stimulation résultant de la synthèse *de novo* de la protéine (Schmitt *et al.*, 1991). Ces premiers résultats ont conduit à penser que cette enzyme était associée aux réponses de défense, notamment dans le renforcement pariétal. La CCoAOMT a depuis été caractérisée dans de nombreuses espèces végétales (Busam *et al.*, 1997b; Baucher *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Martz *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999b). Si l'expression de la CCoAOMT a tout d'abord été reliée à la défense des plantes, les techniques d'hybridation *in situ* ou de RT-PCR ont permis de montrer que la CCoAOMT est exprimée dans le phloème et le xylème de tiges âgées et de pétioles de *Zinnia elegans* (Ye *et al.*, 1994, 2001), mais aussi dans les tiges de tabac (Ye, 1997; Martz *et al.*, 1998), de luzerne (Inoue *et al.*, 1998) et de persil (Grimmig *et al.*, 1999). D'autre part, l'immunolocalisation de l'enzyme ainsi que l'utilisation d'un gène rapporteur (GUS) ont démontré que l'expression de l'enzyme est associée à la lignification dans plusieurs espèces végétales (Ye, 1997; Li *et al.*, 1999b; Grimmig *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2001). Ces résultats sont renforcés par la mise en évidence d'une augmentation de l'activité CCoAOMT concomitante avec la formation des trachéides (Ye *et al.*, 1994) et la synthèse de lignine (Inoue *et al.*, 1998; Grimmig *et al.*, 1999). Toutes les CCoAOMTs isolées semblent méthyler spécifiquement les esters de CoA plutôt que les formes libres, avec une meilleure affinité pour le caféoyl-CoA

(Meng *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998; Martz *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999b; Maury *et al.*, 1999; Parvathi *et al.*, 2001). Ces résultats démontrent l'importance de la CCoAOMT dans la lignification.

La spécificité de substrat stricte de la CCoAOMT vis à vis des esters de CoA constitue une caractéristique intéressante surtout quand on la compare au large spectre d'activité des COMTs. Une étude de type « structure-fonction » a été entreprise au laboratoire afin de comprendre pourquoi la CCoAOMT méthylait spécifiquement le caféoyl-CoA. Les résultats seront présentés dans le chapitre 2 de ma thèse.

1.3.4.2 Les acide caféique OMTs (COMTs)

Ces enzymes ont été purifiées et clonées dans un grand nombre d'organismes végétaux (Baucher *et al.*, 1998). En particulier, trois isoformes ont été purifiées chez le tabac (Legrand *et al.*, 1976b; Collendaveloo *et al.*, 1981). Elles sont regroupées en deux classes selon leur profil d'expression et leur spécificité de substrat.

La COMT de classe I (COMT I), caractérisée dans de nombreuses plantes, est exprimée de manière constitutive dans la tige et intervient dans la synthèse des unités syringyles de la lignine comme l'ont montré des expériences de transgénèse (Atanassova *et al.*, 1995; Van Doorselaere *et al.*, 1995) (voir paragraphe 2.5.4). Les études d'expression de la COMT par northern-blot et « tissu printing » ont montré que les COMTs des différentes espèces s'expriment préférentiellement dans les tissus vasculaires conducteurs mais aussi dans des tissus variés comme la racine, la fleur et les feuilles (Suelves et Puigdomènech, 1998). Leur expression est également stimulée à la suite de l'application d'éliciteurs ou après infection par le VMT (Legrand *et al.*, 1978; Boudet *et al.*, 1995; Baucher *et al.*, 1998; Walter, 1992). Des études d'hybridation *in situ* ont permis de montrer que la COMT était associée aux vaisseaux de xylème dans les tissus jeunes de tabac et de luzerne (Jaeck *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 1998), ou dans le phloème (tissus jeunes et âgés) et le xylème des tissus âgés chez *Zinnia* (Ye et Varner, 1995). Ces résultats contrastés peuvent s'expliquer par le fait que la COMT I, tout comme la CCoAOMT, est impliquée dans la formation de différents types de lignine dans différents types cellulaires. En effet, les unités syringyles se déposent surtout dans les parois secondaires formées tardivement. De plus, la COMT de Gymnosperme catalyse principalement la méthylation de l'acide caféique en accord avec l'absence d'unités syringyles chez ces plantes (Higuchi *et al.*, 1977). Ces différences de spécificité de substrats entre Angiospermes et Gymnospermes pourraient être à l'origine des différences de composition monomérique de la lignine. Cependant, cette hypothèse est peut-être à revoir depuis la caractérisation de l'AEOMT de pin présentant des homologues avec la COMT et capable de méthyler *in vitro* les formes libres et estérifiées des acides caféique et 5-hydroxyfêrulique (Li *et al.*, 1997).

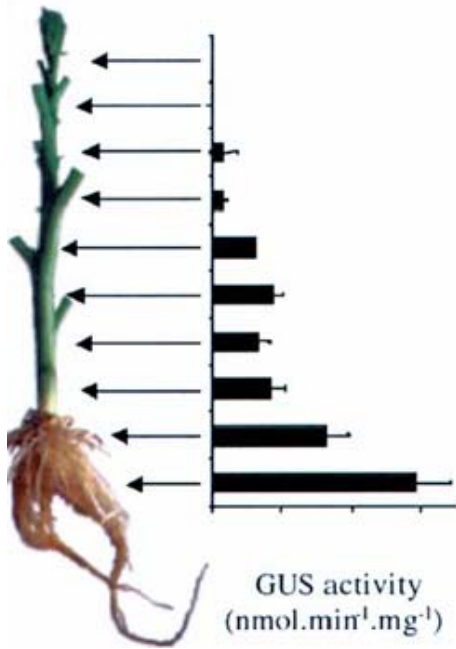
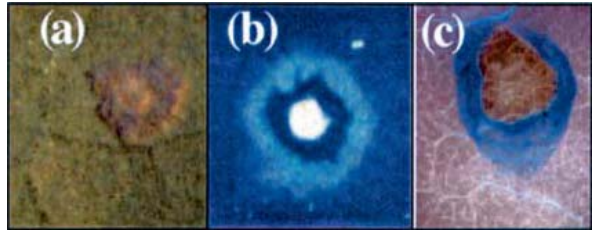
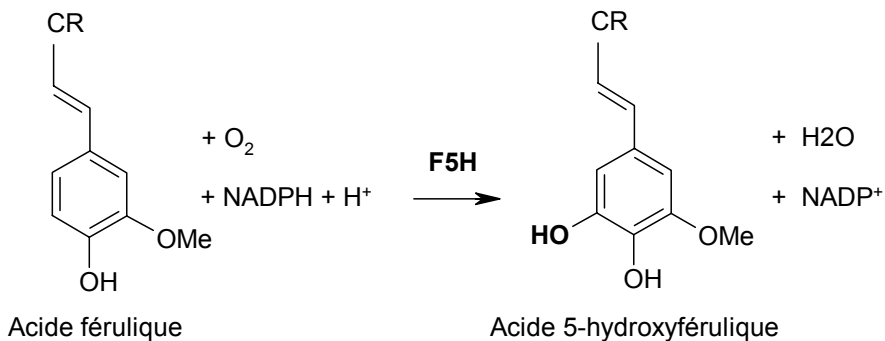
A**B**

Figure 29. Rôle physiologique de la COMT II. (Toquin *et al.*, 2003).

A : mesure de l'activité GUS dans différents tissus lignifiés de tabac transgénique exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de la COMT II.

B : observation de nécroses lors de la réaction hypersensible de *Nicotiana tabacum* vis-à-vis du VMT. (a) : sous lumière visible; (b) : sous U.V.; (c) : mise en évidence de l'expression du gène GUS sous le contrôle du promoteur de la COMT II.



R = OOH ; acide férulique
 R = OH ; coniferaldéhyde
 R = H₂OH ; coniferyl alcool

R = OOH ; acide 5-hydroxyférulique
 R = OH ; 5-hydroxyconiferaldéhyde
 R = H₂OH ; 5-hydroxyconiferyl alcool

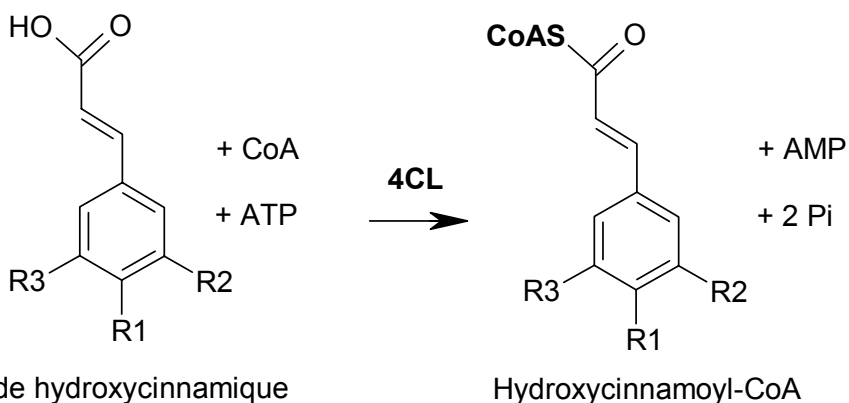
Figure 30. Réaction catalysée par la **F5H**, férulate 5-hydroxylase : hydroxylation en position 5 du noyau aromatique. Le meilleur substrat et le produit correspondant sont soulignés.

Les études de spécificité de substrat de la COMT I ont permis de préciser sa fonction (**Fig. 28**). En effet, des études sur la COMT I recombinante de tabac ont montré qu'elle accepte *in vitro* les acides caféique et 5-OH férulique mais aussi les esters de CoA correspondants ainsi que l'alcool 5-hydroxy coniférylique (5-OH coniférylique) (Maury *et al.*, 1999) et le 5-OH coniféraldéhyde (Osakabe *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999a). Ces résultats sont intéressants au vu d'autres travaux. Le premier d'entre eux concerne l'étape d'hydroxylation de l'acide férulique (F5H) qui peut se faire au niveau du coniféraldéhyde et de l'alcool coniférylique, avec une préférence pour l'aldéhyde (**Fig. 5**) (Osakabe *et al.*, 1999; Humphreys *et al.*, 1999). D'autre part, des études de marquage ont permis de montrer que l'alcool coniférylique marqué s'incorpore dans les unités syringyles de la lignine, ce qui suggère que la synthèse des unités S peut se faire via les alcools et pas seulement par les acides libres comme le suggéraient les études *in vitro* (Chen *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 2000). Ces résultats mettent en évidence l'existence, *in vivo*, d'une voie de méthylation en position 5 plus probable au niveau des intermédiaires aldéhydes ou alcools (**Fig. 5**) (Li *et al.*, 2000a; Chen *et al.*, 2001). Ces données ont conduit à renommer les enzymes CALd5H (pour Coniféraldéhyde 5-hydroxylase) et AldOMT (pour 5-hydroxyconiféraldéhyde *O*-méthyltransférase) (voir paragraphe 1.4.2., Fig. 37).

Enfin, la COMT de classe II a été caractérisée chez deux plantes seulement, le tabac (Pellegrini *et al.*, 1993) et l'orge (Lee *et al.*, 1997a). Elle semble s'exprimer spécifiquement dans les tissus racinaires et est induite lors des réactions de défense (**Fig. 29**) (Toquin *et al.*, 2003). La COMT II semble plus étroitement liée aux réponses de défense.

1.3.5 La férulate 5-hydroxylase (F5H)

La F5H catalyse l'étape d'hydroxylation en position 5 du noyau aromatique (**Fig. 30**). Cette enzyme est une mono-oxygénase à cytochrome P450 distincte de la C4H et appartenant à une nouvelle sous-famille de P450, appelée CYP84 (Grand, 1984; Meyer *et al.*, 1996; Schuler, 1996). Elle a été caractérisée à partir de fractions microsomales de tige de peuplier et son activité la plus forte a été observée au niveau des tissus du xylème (Grand, 1984). On a longtemps considéré que cette réaction d'hydroxylation se déroulait au niveau de l'acide bien que l'enzyme se montre peu efficace vis-à-vis de l'acide férulique. Mais, Osakabe et Coll. (1999) et Humphreys et Coll. (1999) ont montré *in vitro*, par des tests d'activité, que l'hydroxylation en position C5 des dérivés monométhoxylés se produisait préférentiellement au niveau du coniféraldéhyde. Ces nouvelles données ont donc conduit à renommer l'enzyme en Coniféraldéhyde5-hydroxylase ou Cald5H. Un certain nombre d'expériences basées sur l'administration de précurseurs radiomarqués ont indiqué que l'étape d'hydroxylation en position 5 pouvait également se dérouler au niveau de l'alcool coniférylique (Chen *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 2000; Parvathi *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2003). Le gène s'exprime



R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, acide *p*-coumarique
 R₁ = R₂ = OH, R₃ = H, acide caféique
 R₁ = OH, R₂ = OCH₃, R₃ = H, acide férulique
 R₁ = R₃ = OH, R₂ = OCH₃, acide 5-hydroxyférulique
 R₁ = OH, R₂ = R₃ = OCH₃, acide sinapique

R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, *p*-coumaroyl-CoA
 R₁ = R₂ = OH, R₃ = H, caféoyl-CoA
 R₁ = OH, R₂ = OCH₃, R₃ = H, féruloyl-CoA
 R₁ = R₃ = OH, R₂ = OCH₃, 5-hydroxyféruloyl-CoA
 R₁ = OH, R₂ = R₃ = OCH₃, sinapoyl-CoA

Figure 31. Réaction catalysée par la **4CL**, *p*-coumarate CoA ligase : synthèse des esters de CoA. Les meilleurs substrats et les produits correspondants sont soulignés.

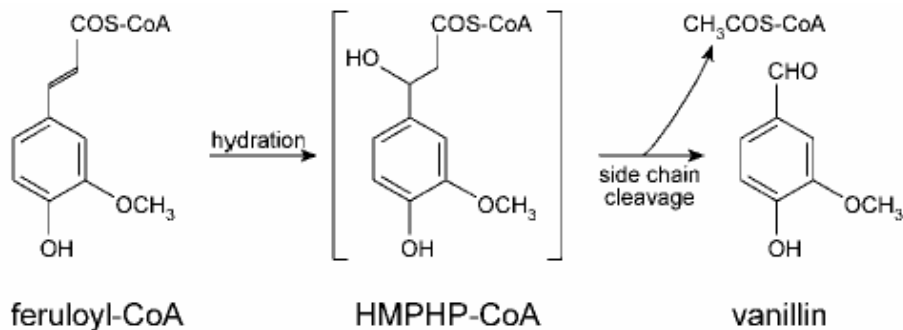


Figure 32. Conversion du féruloyl-CoA en vaniline par la enoyl-CoA hydratase/lyase. Cette enzyme bactérienne catalyse, *in vitro*, l'hydratation et le clivage du féruloyl-CoA pour produire la vaniline et une molécule d'acétyl-CoA (Mayer *et al.*, 2001).

principalement dans les tiges, les racines, les jeunes feuilles et les feuilles sénescentes (Ruegger *et al.*, 1999; Nair *et al.*, 2000).

Un mutant d'*Arabidopsis* déficient en Cald5H (F5H), appelé *f5h*, a été caractérisé il y a près de 11 ans (Chapple *et al.*, 1992). Le criblage, réalisé par CCM, est basé sur l'absence d'un composé majeur dérivant du métabolisme des phénylpropanoïdes, le sinapoylmalate (**Fig. 17 et 18**) (Chapple *et al.*, 1992). Ces mutants ne présentaient aucune modification dans leur développement. L'impact sur la biosynthèse de la lignine sera présenté dans la partie 2.5.6.

1.3.6 La coumarate CoA ligase (4CL)

Cette enzyme ATP-dépendante permet la formation d'esters de CoA à partir de plusieurs acides hydroxycinnamiques (**Fig. 31**). Ces esters de CoA, en particulier le *p*-coumaroyl-CoA et le féruloyl-CoA, sont les précurseurs de métabolites variés. Ces composés thioesters constituent un point de branchement important entre le métabolisme général des phénylpropanoïdes et les voies conduisant à la synthèse de nombreux composés dont la lignine (**Fig. 3**). La 4CL a été décrite chez de nombreux végétaux (Baucher *et al.*, 1998), et selon les espèces, comprend une ou plusieurs isoformes. Les études d'expression de la 4CL dans les différentes espèces ont montré qu'elle s'exprime dans les tiges, les racines et les fleurs de la plupart des plantes mais aussi dans les feuilles de *Solanum tuberosum*. La 4CL se trouve aussi stimulée par la blessure, l'élicitation ou l'infection fongique (Baucher *et al.*, 1998). Les profils d'expression se révèlent souvent similaires à ceux de la PAL.

Les esters de CoA représentent les formes activées des acides hydroxycinnamiques correspondants. Ce point sera discuté dans le Chapitre 1. L'importance de ces molécules en tant qu'intermédiaires métaboliques de la voie des phénylpropanoïdes a été démontrée récemment par une approche de génie génétique. Des tabacs ont été transformés avec un gène bactérien codant pour une enzyme à activité Enoyl-CoA Hydratase/Lyase, convertissant les esters de CoA d'acide coumarique, caféique et férulique en leur hydrobenzaldehyde correspondant (**Fig. 32**). Ces plantes présentent une croissance réduite, une sénescence de feuilles, une stérilité mâle, une distorsion des vaisseaux conducteurs et une modification de la biosynthèse de la lignine. L'équilibre des principaux composés phénoliques est également perturbé puisqu'une diminution de 85% de la quantité d'acide chlorogénique a été observée avec en parallèle une accumulation massive de nouveaux métabolites, incluant l'acide vanilique et des dérivés glucosylés (Mayer *et al.*, 2001).

L'existence de plusieurs isoformes de 4CL dans les plantes pourrait suggérer un rôle distinct de chacune des isoformes. C'est ce que suggère l'étude récente de Lindermayr et Coll. (2002) qui ont isolé quatre ADNc de soja codant pour des 4CL. Ils ont montré, qu'en plus des fortes divergences de spécificité de substrat, les protéines codées par cette petite famille de gènes présentaient des profils d'expression très variés. En effet, les isoformes 3 et 4, dont

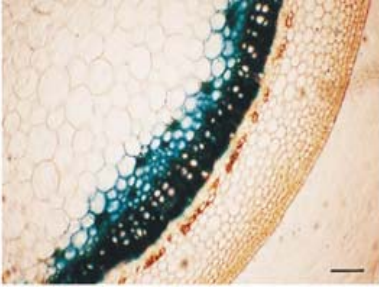
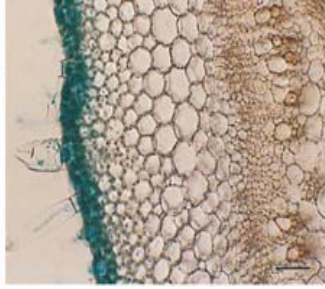
A**B**

Figure 33. Analyses histochimiques de coupes transversales de tiges de deux lignées de tabacs transgéniques. Etudes de l'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle de deux promoteurs de deux isoformes différentes de 4CL (Peuplier). (Hu *et al.*, 1998).

A : expression localisée pour une des isoformes au niveau des vaisseaux du xylème,

B : et pour l'autre au niveau de l'épiderme.

l'expression constitutive dans les plantules est faible, présentent une forte stimulation de leur expression en réponse aux β -glucanes de *Phytophthora infestans*. Par contre, les transcripts des isoformes 1 et 2 s'accumulent fortement à différentes hauteurs de tige et leur expression n'est pas affectée ou est réprimée lors de l'élicitation (Lindermayr *et al.*, 2002). Ces données suggèrent un rôle dans le développement et la croissance de la plante pour les isoformes 1 et 2, et un rôle en réponse aux stress pour les isoformes 3 et 4. D'autres études ont été réalisées sur le peuplier avec pour objectif d'attribuer à chacune des deux isoformes de 4CL présentes chez cette plante un rôle physiologique. Des études biochimiques, basées sur des tests de compétition de substrats, ont permis de montrer que l'isoforme 1 utilisait de façon préférentielle l'acide caféique et l'isoforme 2 l'acide *p*-coumarique. Parallèlement, des expériences d'hybridation *in situ* et de gène rapporteur (GUS) ont permis aux auteurs d'avancer que l'isoforme 1 utilisait l'acide caféique comme substrat pour conduire à la biosynthèse de la lignine au niveau du xylème mature et des fibres du phloème. L'utilisation préférentielle de l'acide *p*-coumarique par l'isoforme 2 et sa localisation au niveau de l'épiderme étaient en faveur d'un rôle de cette enzyme dans la biosynthèse des flavonoïdes (**Fig. 33**) (Harding *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 1998).

Ehltling et Coll. (1999) ont étudié l'expression de trois gènes de 4CL d'*Arabidopsis* : *At4CL1*, *At4CL2* et *At4CL3*. Les auteurs ont montré que *At4CL1* et *At4CL2* ont des profils d'expression similaires, à savoir une induction par l'infection fongique, la blessure et les U.V., *At4CL1* étant également fortement exprimé dans la tige saine et la racine. Le gène *At4CL3* n'est induit que par les U.V., son expression étant plus spécifique de la fleur et des feuilles. Ces résultats suggèrent l'implication du gène *At4CL3* dans le cheminement du *p*-coumarate vers les flavonoïdes tandis que les deux autres gènes semblent plus spécifiquement impliqués dans la lignification.

A partir de xylème, de cellules élicitées et de feuilles de peuplier (*Populus trichorpa* X *Populus deltoides*), Allina et Coll. (1998) ont mis en évidence l'existence de plusieurs isoformes de 4CL qui ont des spécificités de substrat similaires. Après élicitation, l'activité 4CL augmente dans les extraits bruts avec les acides *p*-coumarique et férulique pour substrats. Cette induction est corrélée avec l'accumulation de phénols estérifiés aux parois, suggérant un guidage des métabolites (Moniz de Sà *et al.*, 1992; Campbell et Sederoff, 1996).

La 4CL utilise de préférence les acides *p*-coumarique et férulique comme substrat (Baucher *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998). Chez les Angiospermes, l'utilisation de l'acide sinapique par la 4CL n'a été observée que dans de rares cas où des extraits bruts de légumineuses telles *Erythrina crista-galli*, ou *Robinia pseudoacacia* ont été testés (Kutsuki *et al.*, 1982). L'incapacité de la 4CL dans la plupart des cas à utiliser l'acide sinapique en tant que substrat est en accord, chez les Gymnospermes, avec l'absence d'unités S et indique que, chez les Angiospermes, la synthèse des unités syringyles passe par les dérivés aldéhydes ou alcools (Osakabe *et al.*, 1999; Humphreys *et al.*, 1999; Maury *et al.*, 1999). La 4CL de peuplier utilise l'acide 5-OH férulique (Grand *et al.*, 1983; Allina *et al.*, 1998), ce qui suggère que la formation

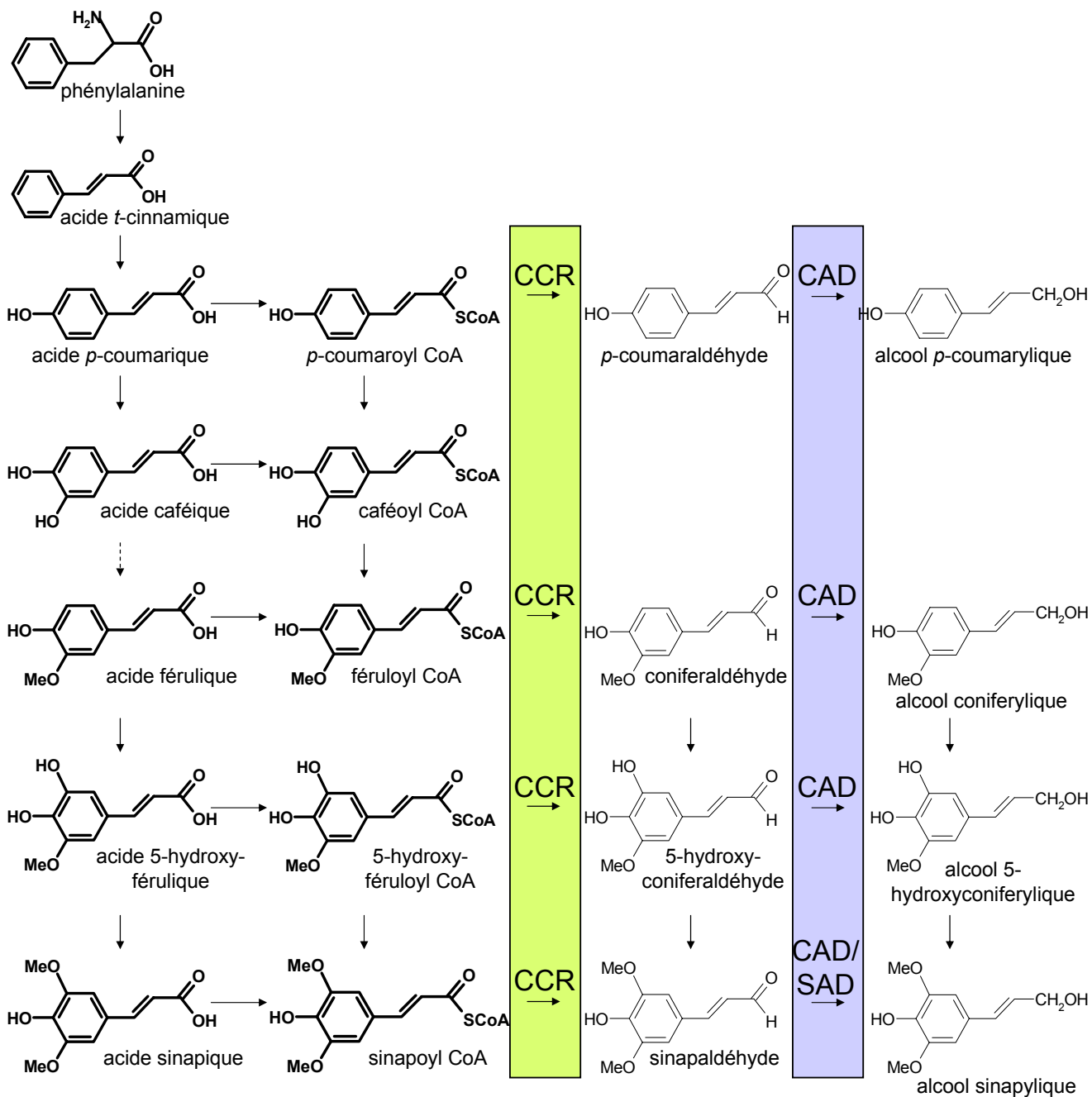


Figure 34. Position des enzymes spécifiques de la voie de biosynthèse de la lignine.

CCR, cinnamoyl-CoA réductase; CAD, cinnamyl alcool déshydrogénase; SAD, sinapyl alcool déshydrogénase.

d'alcool sinapylique peut se faire (après réduction) via la méthylation du 5-OH coniféraldéhyde ou de l'alcool 5-OH coniférylique. Cette hypothèse est renforcée par les expériences de marquage à l'aide de précurseurs radioactifs, montrant que l'alcool sinapylique peut être synthétisé à partir de l'alcool 5-OH coniférylique (Chen *et al.*, 1999; Matsui *et al.*, 2000).

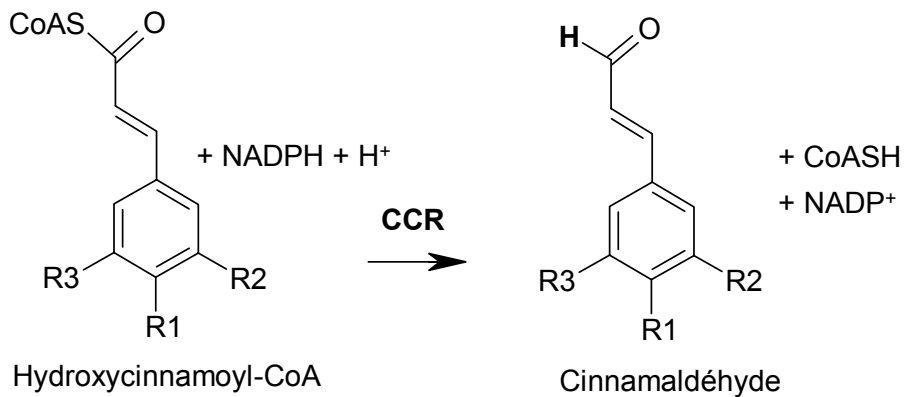
Pour mieux comprendre la base moléculaire des spécificités de substrats des diverses isoformes de 4 CL, de nombreux travaux de mutagenèse ont été entrepris (Stuible *et al.*, 2000; Ehling *et al.*, 2001; Lindermayr *et al.*, 2003). Ces études ont permis d'identifier un certain nombre d'acides aminés et de domaines jouant un rôle dans la reconnaissance et la sélectivité des substrats. Il a notamment été possible, en délétant un seul acide aminé, de conférer à deux 4CL de soja la capacité de convertir efficacement l'acide sinapique en ester de CoA (Lindermayr *et al.*, 2003). Cette approche pourrait être utilisée comme outil pour obtenir des plantes transgéniques synthétisant une lignine « sur mesure ».

1.4 Les enzymes spécifiques de la voie de biosynthèse de la lignine

La voie qui conduit à la biosynthèse de la lignine peut être divisée en trois parties principales (**Fig. 3**) : **la voie du shikimate** qui va former les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr et Trp), puis, le **métabolisme des phénylpropanoïdes** qui débute par la Phe et conduit à la biosynthèse des HCAs et de leur esters de CoA (**Fig. 19**). Ces derniers jouent un rôle central dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Ils sont les précurseurs de plusieurs classes majeures de composés dont la lignine. Et enfin, **la voie spécifique de la lignine** qui implique deux étapes successives de réduction des esters de CoA en alcools, catalysées par la cinnamoyl-CoA réductase (CCR) puis la cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD) (**Fig. 34**). Ces unités monomériques sont ensuite polymérisées dans la matrice extra-cellulaire via un processus oxydatif. Voici les principales caractéristiques des enzymes conduisant à la biosynthèse de la lignine à partir des esters de CoA.

1.4.1 La cinnamoyl-CoA réductase (CCR)

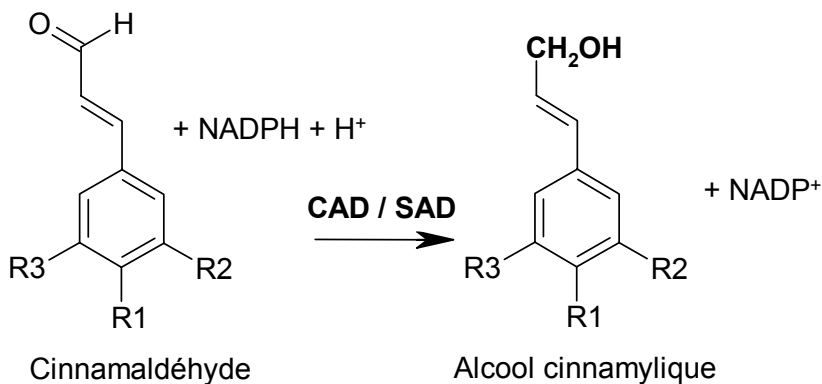
Cette enzyme permet, à partir de la voie générale des phénylpropanoïdes, de catalyser la première étape conduisant aux monomères de lignine et constitue une étape clé dans le contrôle du flux métabolique dirigé vers la synthèse de la lignine. La CCR permet la conversion des esters de CoA en aldéhydes correspondants en utilisant le NADPH comme donneur d'électrons (**Fig. 35**, au verso). Cette enzyme a été purifiée à partir de cultures cellulaires de soja (Wengenmayer *et al.*, 1976; Lüderitz et Grisebach, 1981), ainsi que chez des espèces variées telles l'épicéa (Lüderitz et Grisebach, 1981), le peuplier (Sarni *et al.*, 1984) et l'eucalyptus (Goffner *et al.*, 1994). La protéine purifiée est monomérique (Lüderitz et Grisebach, 1981; Goffner *et al.*, 1994) et accepte tous les esters de CoA comme substrats. La CCR d'épicéa fait



R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, *p*-coumaroyl-CoA
 R₁ = OH, R₂ = OCH₃, R₃ = H, féruloyl-CoA
 R₁ = R₃ = OH, R₂ = OCH₃, 5-hydroxyféruloyl-CoA
 R₁ = OH, R₂ = R₃ = OCH₃, sinapoyl-CoA

R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, *p*-coumaraldéhyde
 R₁ = OH, R₂ = OCH₃, R₃ = H, coniferaldéhyde
 R₁ = R₃ = OH, R₂ = OCH₃, 5-hydroxyconiferaldéhyde
 R₁ = OH, R₂ = R₃ = OCH₃, sinapaldéhyde

Figure 35. Réaction catalysée par la **CCR**, cinnamoyl-CoA réductase : réduction des esters de CoA en aldéhydes.



R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, *p*-coumaraldéhyde
 R₁ = OH, R₂ = OCH₃, R₃ = H, coniferaldéhyde
 R₁ = R₃ = OH, R₂ = OCH₃, 5-hydroxyconiferaldéhyde
 R₁ = OH, R₂ = R₃ = OCH₃, sinapaldéhyde

R₁ = OH, R₂ = R₃ = H, alcool *p*-coumarylique
 R₁ = OH, R₂ = OCH₃, R₃ = H, alcool coniferylique
 R₁ = R₃ = OH, R₂ = OCH₃, alcool 5-hydroxyconiferylique
 R₁ = OH, R₂ = R₃ = OCH₃, alcool sinapylique

Figure 36. Réaction catalysée par la **CAD (ou la SAD)**, cinnamyl (ou sinapyl) alcool déshydrogénase : réduction des aldéhydes en alcools. Le meilleur substrat de la SAD et le produit correspondant sont soulignés.

exception puisque son efficacité de conversion du sinapoyl-CoA est très faible, en accord avec l'absence d'unités syringyles chez les Gymnospermes. De plus, l'enzyme présente une meilleure efficacité de conversion avec le féruloyl-CoA, de l'ordre de trois fois plus élevée par rapport aux autres esters de CoA (Boudet *et al.*, 1995; Lauvergeat *et al.*, 2001). L'ADNc a été isolé chez le tabac (O'Connell *et al.*, 2002), l'eucalyptus (Lacombe *et al.*, 1997), le peuplier, la luzerne (Baucher *et al.*, 1998) et *Arabidopsis* (Jones *et al.*, 2001; Lauvergeat *et al.*, 2001). Deux ADNc de CCR ont été caractérisés dans le maïs (Pichon *et al.*, 1998). Les ARNm de CCR d'eucalyptus s'accumulent dans les feuilles, les racines, les tiges (particulièrement le xylème). Chez le maïs, deux types de messagers s'accumulent avec des profils d'expression différents : le gène *ZmCCR2* s'exprime spécifiquement dans la racine tandis que les transcrits du gène *ZmCCR1* s'accumulent dans tous les tissus. Ce dernier gène serait plus spécifiquement impliqué dans la lignification (Pichon *et al.*, 1998). Chez *Arabidopsis*, Lauvergeat et Coll. (2001) ont étudié deux ADNc codant pour une CCR (AtCCR1 et AtCCR2). *In vitro*, les deux protéines réduisent préférentiellement l'ester de féruloyl-CoA, avec une efficacité cinq fois plus élevée pour AtCCR1. Les deux gènes sont exprimés de façon différentielle au cours du développement et en réponse à une infection. *AtCCR1* est essentiellement exprimé dans les tissus lignifiés. A l'opposé, *AtCCR2*, qui s'exprime faiblement au cours du développement, est fortement et transitoirement induit lors de l'interaction incompatible avec *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

1.4.2 La cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD)

La CAD utilise le NADPH comme cofacteur et permet la conversion des aldéhydes en alcools correspondants (**Fig. 36**). Cette enzyme a été purifiée chez de nombreuses espèces tels le peuplier (Sarni *et al.*, 1984), le soja, l'épicéa (Lüderitz et Grisebach, 1981), l'eucalyptus, le tabac, le haricot (Baucher *et al.*, 1998). Il peut exister un ou deux gènes de CAD chez les plantes. Elles diffèrent par leur séquence, leur poids moléculaire et leur spécificité de substrat (Boudet *et al.*, 1995). L'isoforme CAD-2 a été identifiée chez toutes les plantes tandis qu'une autre isoforme, CAD-1, est également trouvée chez l'eucalyptus et le haricot (Baucher *et al.*, 1998). L'ADNc correspondant à l'enzyme CAD-1 d'*Eucalyptus gunnii* a été cloné par Goffner Coll. (1998). L'expression du gène *CAD-1* est associée aux tiges et feuilles, mais pas aux racines chez *Z. elegans*. De plus, cette enzyme n'accepte pas le sinapaldéhyde comme substrat (Goffner *et al.*, 1992, Goffner *et al.*, 1998). L'expression du gène *CAD-1* est induite lors de la différenciation des vaisseaux du xylème (Sato *et al.*, 1997). L'enzyme CAD-2 comprend deux isoformes selon les espèces : une isoforme correspondant à l'homodimère et une autre à l'hétérodimère ont été identifiées. L'enzyme d'Angiosperme accepte les trois aldéhydes en tant que substrat tandis que l'enzyme de Gymnosperme n'utilise pas le sinapaldéhyde (O'Malley *et al.*, 1992; Galliano *et al.*, 1993). L'eucalyptus a la particularité d'exprimer l'homodimère et

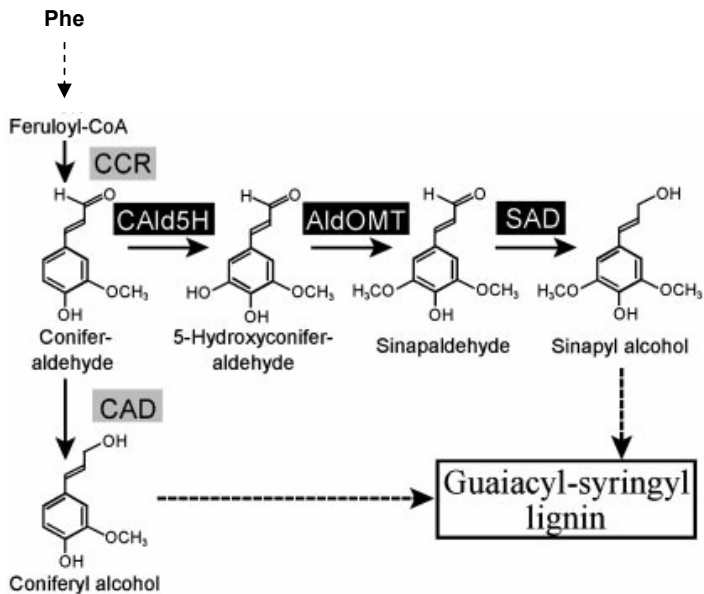


Figure 37. Voie biosynthétique proposée par Li et Coll. (2001, 2003) conduisant aux monolignols chez les Angiospermes.

CCR, cinnamoyl-CoA réductase; CAld5H, Coniferaldéhyde 5-hydroxylase; AldOMT, 5-hydroxyconiferaldéhyde O-méthyltransférase; SAD, sinapyl alcool déshydrogénase; CAD, cinnamyl alcool déshydrogénase. (Li *et al.*, 2001, 2003).

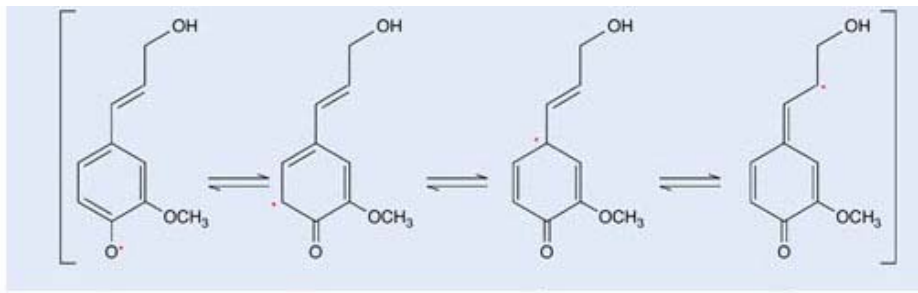
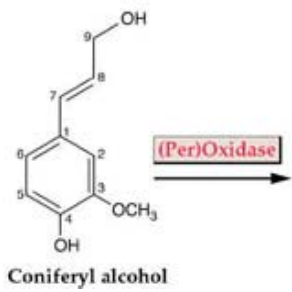
l'hétérodimère (Hawkins et Boudet, 1994). L'homodimère présente une meilleure affinité pour le sinapaldéhyde tandis que l'hétérodimère catalyse la réduction du coniféraldéhyde et du sinapaldéhyde (Hawkins et Boudet, 1994). L'étude de l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur du gène *CAD-2* d'eucalyptus montre que ce gène est associé à la lignification, mais aussi à la formation des racines latérales (Samaj *et al.*, 1998). Des études d'expression, par « northern-blot », des deux isoformes de la luzerne ont également montré une inductibilité des deux gènes à la blessure (Brill *et al.*, 1999). L'activité CAD est également induite par des éliciteurs chez les dicotylédones (Baucher *et al.*, 1998). Ruelland et Coll. (2003) ont détecté, par immunolocalisation, la protéine CAD au niveau du xylème, chez le maïs et la canne à sucre, deux monocotylédones.

Récemment, Li et Coll. (2001) ont isolé chez le peuplier un nouveau gène (*PtSAD*) codant pour une sinapyl alcool déshydrogénase (SAD) qui est phylogénétiquement distincte du gène *PtCAD* (53% d'identité entre les deux séquences protéiques). Les études biochimiques ont montré que l'enzyme SAD est spécifique du sinapaldéhyde alors que l'enzyme CAD est elle, spécifique du coniféraldéhyde. En effet, l'efficacité enzymatique de la SAD pour le sinapaldéhyde se montre 60 fois supérieure à celle de la CAD. Dans la tige de peuplier, la SAD est essentiellement immunolocalisée au niveau des tissus et des structures lignifiés riches en unités S (fibres du phloème), alors que la CAD est détectée au niveau des cellules riches en unités G (vaisseaux du xylème). Ces résultats suggèrent que la SAD et la CAD ont des fonctions distinctes et que leur expression est régulée dans le temps et dans l'espace selon le type de lignine à synthétiser. Il a également été montré par immunodétection que les protéines SAD et CAD sont présentes chez six espèces d'Angiospermes, alors que la SAD n'est pas détectée chez le pin, un Gymnosperme. Ces données suggèrent que l'enzyme SAD est essentielle à la biosynthèse des unités syringyles chez les Angiospermes. La découverte de ce nouveau gène (*PtSAD*) codant pour une SAD (spécifique des unités S) appuie l'idée selon laquelle la voie de biosynthèse des unités S aurait son point de branchement au niveau du coniféraldéhyde (Matsui *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000). Ce dernier servirait à la synthèse des unités G via le coniferyl alcool après action de la CAD, mais serait également pris en charge par la CAld5H (ou F5H), la AldOMT (ou COMT) puis la SAD pour conduire à l'unité S (**Fig. 37**) (Li *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2003).

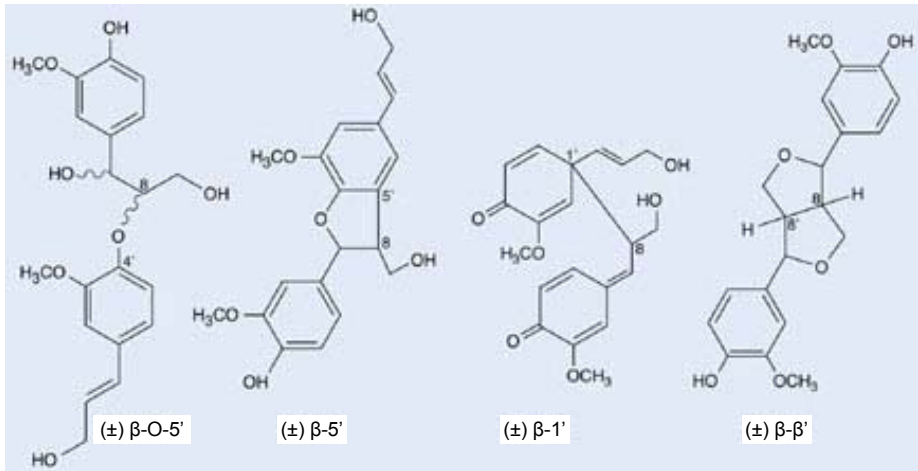
1.4.3 Stockage et transport des unités monolignols

1.4.3.1 L'alcool coniférylique UDP-glucose glucosyltransférase

Réaction : UDP-glucose + cinnamyl alcool \rightarrow cinnamyl 4-O- β glucoside + UDP

A

Couplage entre radicaux libres
par voie enzymatique (Protéines
directrices) ou non enzymatique

**B**

Répétition du processus ----->

Formation du polymère de lignine

Figure 38. Proposition d'un modèle de polymérisation des monomères de lignine dans la matrice extracellulaire. (Buchanan *et al.*, 2001).

A : génération de radicaux phenoxy à partir d'alcool coniferylique, sous l'action d'une activité oxidase.

B : couplage de deux radicaux phenoxy dirigés ou non par des protéines et conduisant à la synthèse d'un dimère racémique (+/-).

Les monolignols sont des composés instables et toxiques pour la cellule (Whetten et Sederoff, 1995). Leur stockage sous forme de glucoside dans un compartiment cellulaire tel que la vacuole serait un moyen de les détoxifier. L'enzyme impliquée est l'alcool coniférylique UDP-glucose glucosyltransférase. Elle a été purifiée chez le pin (Leinhos *et al.*, 1994) et *Forsythia* (Ibrahim, 1977) où elle s'avère très spécifique des alcools coniférylique et sinapylique. Récemment, une analyse phylogénétique des séquences du génome d'*Arabidopsis* a révélé l'existence d'une famille multigénique codant pour des glucosyltransférases putatives (Lim *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002). La caractérisation biochimique de 90 protéines recombinantes a permis d'identifier deux gènes codant pour des enzymes glucosylant l'alcool sinapylique et l'alcool coniférylique (Lim *et al.*, 2001). Les glucosides de monolignols ainsi formés sont transportés puis incorporés dans la paroi.

1.4.3.2 La coniférine β -glucosidase

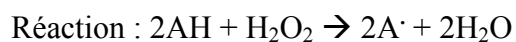
Réaction : cinnamyl 4-O- β glucoside \rightarrow cinnamyl alcool + glucose

Comme nous venons de le voir, les monolignols sont stockés sous forme de glucosides. Des expériences à l'aide de coniférine (glucoside de l'alcool coniférylique) marquée ont montré que la radioactivité était incorporée dans la paroi (Terashima *et al.*, 1988), ce qui suggère l'existence d'une glucosidase associée à la lignification (Baucher *et al.*, 1998). Une coniférine β -glucosidase utilisant la coniférine et dans une moindre mesure la syringine a effectivement été purifiée et récemment clonée chez le pin (Dharmawardhana *et al.*, 1999).

Les monolignols ainsi libérés dans la paroi sont polymérisés par des enzymes extracellulaires de types polyphénol-oxidases. Deux classes distinctes d'enzymes, les peroxydases et les laccases qui utilisent respectivement le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'oxygène moléculaire (O₂), sont responsables de cette polymérisation oxydative grâce à la génération de radicaux réactifs (**Fig. 38A**). La polymérisation de la lignine débute donc par une déshydrogénation des alcools cinnamiques suivi par un couplage des radicaux phenoxy (**Fig. 38B**).

1.4.4 Polymérisation des unités monolignols

1.4.4.1 Les peroxydases



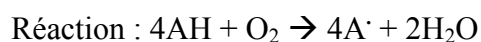
Avec AH un donneur d'hydrogène (notamment aromatique) et A \cdot le produit déshydrogéné.

Les plantes supérieures possèdent une large gamme de peroxydases dites « classiques » (classe III). Ces enzymes vacuolaires ou pariétales participent à de nombreux processus physiologiques tels que la détoxification du H₂O₂, le catabolisme de l'auxine, la lignification, la synthèse de la subérine, l'élaboration de liens intermoléculaires entre polysaccharides pariétaux, l'insolubilisation de protéines structurales, l'oxydation de phénols ou encore la résistance aux agents pathogènes.

Lors de la lignification, les peroxydases catalysent, en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la formation de radicaux phenoxy à partir des alcools qui seraient ensuite polymérisés (Baucher *et al.*, 1998). Il existe de nombreuses isoformes classées selon leur point isoélectrique, les peroxydases anioniques, neutres ou cationiques. Plusieurs peroxydases spécifiques de la lignification ont été caractérisées (Baucher *et al.*, 1998; Quiroga *et al.*, 2000). Cinq peroxydases anioniques de xylème de peuplier ont été purifiées (Christensen *et al.*, 1998). Parmi elles, deux enzymes PXP3-4 et PXP-5 ont été clonées et utilisent la syringaldazine, suggérant que ces enzymes pourraient être impliquées dans la polymérisation des précurseurs de la lignine (Christensen *et al.*, 2001). Osakabe et Coll. (1995) ont isolé deux gènes de peroxydases anioniques de peuplier organisés en tandem, le gène *prxA3a* s'exprimant dans les parties jeunes de la tige. L'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle d'un promoteur de peroxydase de riz a permis de localiser son expression au niveau des vaisseaux conducteurs et d'identifier une région *cis* du promoteur responsable d'une réponse aux U.V. et à la blessure (Ito *et al.*, 2000). Chez *Zinnia*, la localisation de H₂O₂ est corrélée avec les zones de lignification (Olson et Varner, 1993). De plus, l'addition de piègeur de H₂O₂ dans des cultures cellulaires d'épicéa inhibe la lignification (Nose *et al.*, 1995). Cependant aucune preuve définitive n'est venue confirmer ces résultats *in vivo*. En effet, l'inhibition de la peroxydase anionique dans des tabacs transgéniques ne provoque pas de diminution de la quantité totale de lignine (Chabbert *et al.*, 1992; Lagrimini *et al.*, 1997). Néanmoins, le grand nombre d'isoformes de peroxydase ne permet pas de conclure puisqu'on ne peut pas exclure une complémentarité fonctionnelle. Tognolli et Coll. (2002) ont recensé 73 peroxydases putatives dans le génome d'*Arabidopsis*. Le profil d'expression de 23 d'entre-elles a été étudié par cDNA array. Toutes les peroxydases étudiées sont exprimées à des niveaux variables dans les racines, les tiges, les feuilles ou les fleurs. Ces données constituent un point de départ intéressant pour déterminer la fonction de l'une ou l'autre de ces enzymes dans les processus de lignification.

Récemment, un nouveau concept de polymérisation des monolignols a été proposé (Onnerud *et al.*, 2002). Les auteurs ont réussi à synthétiser, *in vitro*, des polymères de haut poids moléculaire qui sont au niveau structural très proche de la lignine naturelle. Ce processus a été obtenu sans qu'à aucun moment la peroxydase soit en contact direct avec les monomères de lignine. Dans ce système, l'oxalate de manganèse joue le rôle d'une navette diffusible au pouvoir redox. Dans un premier temps, le manganèse est oxydé (Mn^{2+} en Mn^{3+}) par la peroxydase, puis, *in planta*, diffuserait dans la paroi pour oxyder les monomères de lignine (Onnerud *et al.*, 2002).

1.4.4.2 Les laccases



L'implication des laccases dans la polymérisation oxydative a été proposée par Sterjiades et Coll. (1993) lorsqu'ils ont montré que les laccases de *Acer pseudoplatanus* étaient capables de polymériser les monolignols en absence de peroxydases. Ainsi les laccases, comme les peroxydases, catalyseraient la formation de radicaux phenoxy mais en présence d'oxygène moléculaire (O_2). Les laccases ont été identifiées dans plusieurs espèces végétales (Baucher *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2001). La liste des espèces chez lesquelles les laccases ont été localisées dans les parois cellulaires de tissus en lignification a été complétée par Richardson *et al.*, (2000) et inclut *Arabidopsis*. Cependant, contrairement aux laccases d'origine fongique, très peu d'études ont été réalisées sur les laccases d'origine végétale (Mayer et Staples, 2002). Chez le pin, une enzyme de xylème est spécifiquement associée à la lignification (Bao *et al.*, 1993). Ranocha et Coll. (1999) ont isolé 5 ADNc de laccases de peuplier qui s'expriment spécifiquement dans la tige. L'une des enzymes de 90 kDa accepte, *in vitro*, l'alcool coniférylique avec la meilleure efficacité mais également le sinapaldéhyde et le coniféraldéhyde pour substrats. Chez le tabac, l'absence de H_2O_2 n'empêche pas l'oxydation de l'alcool coniférylique, avec en parallèle une augmentation de la consommation de O_2 dans le xylème (Mc Dougall *et al.*, 1994) suggérant l'intervention probable d'une laccase dans la polymérisation des monomères de lignine. La démonstration de l'implication des laccases dans le processus de lignification a été tentée par Wallace et Fry (1999) en mesurant la capacité d'oxydation de composés phénoliques d'un certain nombre de peroxydases et de laccases. Les résultats montrent que les peroxydases possèdent une activité spécifique supérieure à celles des laccases. Ainsi, le rôle des laccases dans la lignification reste obscur comme en fait état Boudet dans sa récente revue (2000). Le problème sera peut être résolu par l'utilisation de mutants ou des expériences d'extinction de gènes.

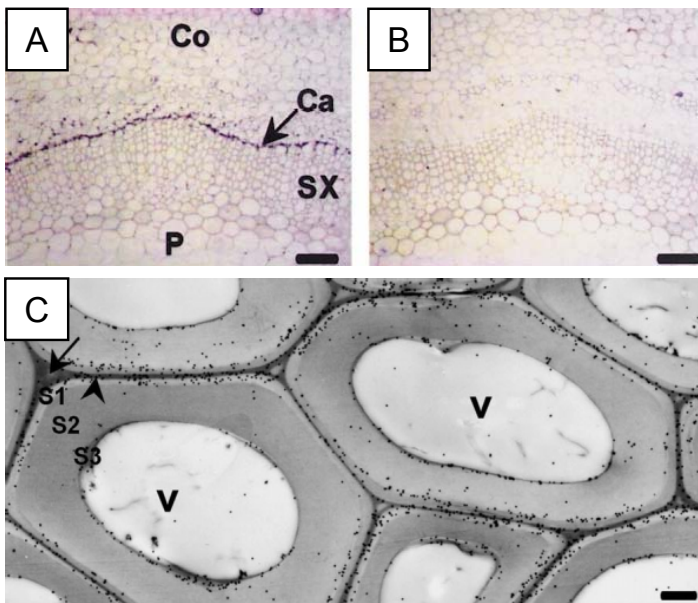


Figure 39. Expression tissulaire et sub-cellulaire des gènes codant pour les protéines directrices dans des tiges de *Forsythia intermedia*. (Burlat *et al.*, 2001).

Hybridation *in situ* d'ARNm de protéines directrices à l'aide de sondes marquées à la digoxigénine.

A : sonde anti-sens, révélant une localisation des ARNm au niveau du cambium.

B : contrôle réalisé avec une sonde sens. (Co, cortex; SX, xylème secondaire; Ca, cambium; Barre = 50μm)

C : Immunolocalisation des protéines directrices au niveau sub-cellulaire par microscopie électronique. Le marquage est localisé au niveau de la couche externe de la paroi secondaire (S1).

(Flèche, coin des cellules; S1, S2 et S3 : couches successives de la paroi secondaire; V, vaisseaux. Barre = 1μm)

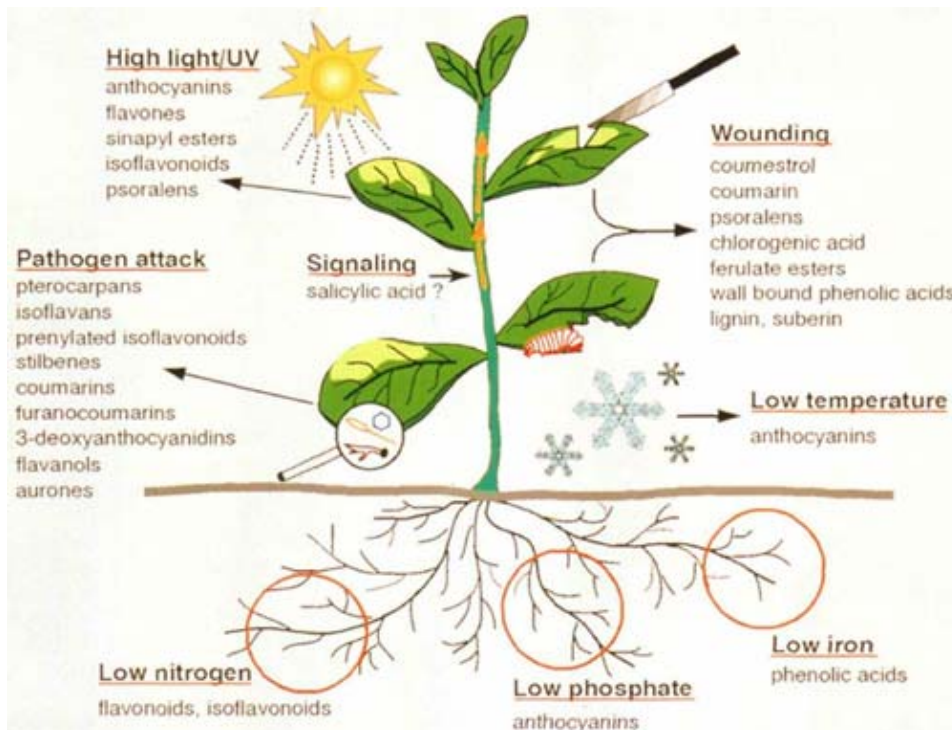


Figure 40. Exemples de divers phénylpropanoïdes induits lors de stress biotiques et abiotiques (Dixon et Paiva, 1995).

Ainsi, la polymérisation des monolignols constitue certainement l'un des processus enzymatiques conduisant à la lignine les moins bien caractérisés. L'assemblage macromoléculaire de la lignine fait actuellement l'objet de controverses et deux modèles sont proposés (Lewis, 1999; Sederoff *et al.*, 1999; Hatfield et Vermerris, 2001).

Le premier modèle favorise le contrôle biochimique de la polymérisation. Celle-ci ne se ferait pas au hasard, mais serait dirigée par des protéines conduisant à la synthèse d'une lignine « ordonnée » (Lewis, 1999; Davin et Lewis, 2000). Ce modèle s'appuie sur le fait que certaines glycoprotéines sont transportées en des endroits précis de la paroi, là où la lignification débiterait (**Fig. 39 A, B et C**) (Müsel *et al.*, 1997; Ryser *et al.*, 1997; Burlat *et al.*, 2001). De plus, une protéine découverte chez *Forsythia*, est capable de contrôler *in vitro* la réaction de couplage de dérivés phenoxy de l'alcool coniférylique et ceci de manière régio- et stéréospécifique, ce qui aboutit à la formation d'un stéréoisomère de lignane (dimère phénolique non structural) (Davin *et al.*, 1997). De plus, des protéines très similaires ont été caractérisées chez d'autres espèces végétales (Gang *et al.*, 1999).

Cependant, ces résultats sont controversés. D'autres travaux (Sederoff *et al.*, 1999) ont montré, qu'après dégradation partielle de la lignine, les oligomères produits ne possèdent pas d'activité optique, suggérant une incorporation des stéréoisomères en quantités égales. Ces auteurs plaident en faveur d'une polymérisation non déterminée et « souple » qui serait essentiellement affectée par la disponibilité des unités monomériques. Ce modèle s'appuie également sur les nombreuses données obtenues grâce aux plantes transgéniques affectées dans la biosynthèse de la lignine. Ces études ont montré que si les teneurs en unités G et/ou S étaient souvent modifiées, la plante était capable d'incorporer de nouvelles unités telles que l'unité H, 5-OHG, l'alcool dihydroconiférylique ou d'augmenter les proportions d'HCAs estérifiés aux parois cellulaires tels que la féruloyl-tyramine (Sederoff *et al.*, 1999). La capacité d'adaptation reflète une certaine souplesse, cette plasticité du système selon les auteurs, se montrant incompatible avec une notion de polymérisation « ordonnée ».

1.5 Le métabolisme des phénylpropanoïdes et les réponses aux stress

Lors de divers stress de nature biotique (agents pathogènes, blessure, symbiose) ou abiotique (lumière, rayonnements U.V., faible température, carences) les plantes mettent en place un certain nombre de réponses conduisant notamment à l'induction de métabolismes secondaires dont celui des phénylpropanoïdes (**Fig. 40**). La nature et la fonction des composés phénoliques s'accumulant dans les plantes sont variables. Certaines molécules sont synthétisées *de novo* et présentent des propriétés anti-microbiennes; ce sont des phytoalexines. Ces composés de défense regroupent différentes classes de phénylpropanoïdes telles que les ptérocarpans (glyceollin), les isoflavonoïdes prénylés (kievitone), les stilbènes (resvératrol), les coumarines (scopolétine), les flavonols (quercétine, kaempférol) ou encore les aurones.

D'autres composés ont des fonctions dans la signalisation comme l'acide salicylique (SA), molécule signal dans les mécanismes de résistance.

La blessure et l'attaque par des herbivores induisent la synthèse de l'acide chlorogénique (CGA) ou d'esters phénoliques liés aux parois cellulaires, ces composés pouvant agir directement en tant que molécules de défense ou servir de précurseurs à la synthèse de la lignine, de la subérine et autres barrières polyphénoliques (Dixon et Paiva, 1995). Par ailleurs, la quantité d'anthocyanines augmente fortement après un stress au froid ou un stress nutritionnel (Christie *et al.*, 1994).

1.5.1 Inductibilité des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes

Il est bien connu que les enzymes de la voie générale des phénylpropanoïdes telles la PAL, la C4H, la 4CL sont induites au cours des réactions de défense, mais aussi suite à d'autres stress biotiques et abiotiques. Les enzymes impliquées dans des voies plus spécifiques, telles les voies de biosynthèse de la lignine et des flavonoïdes sont également inductibles (Legrand, 1983; Walter, 1992; Dixon et Paiva, 1995). Ainsi, les activités PAL, C4H, CCoAOMT, COMT, et peroxydase de tabac augmentent dans les tissus entourant les lésions après infection par le VMT (Legrand *et al.*, 1976a; Martz *et al.*, 1998). Dans le cas de la PAL et de la COMT, une synthèse *de novo* de l'enzyme a pu être démontrée (Collendaveloo *et al.*, 1982). Deux types de peroxydase de feuilles de tabac sont induits différemment selon le type de stimulus : les peroxydases cationiques sont préférentiellement induites après blessure tandis que les peroxydases anioniques sont induites après infection par le VMT (Lagrimini et Rothstein, 1987).

Une induction des enzymes de la voie des flavonoïdes est également observée lors d'une infection par un agent pathogène ou lors d'une surexposition à une source lumineuse (Dixon et Paiva, 1995). Des études réalisées sur *Arabidopsis* ont montré une augmentation de l'accumulation de conjugués kaempférol (flavonoïdes) et d'esters sinapiques en réponse aux rayonnements U.V. (Li *et al.*, 1993; Lois, 1994; Lois et Buchanan, 1994). Des plantes mutées et affectées dans l'expression de la chalcone synthase (CHS) et de la chalcone isomérase (CHI) sont plus sensibles aux rayonnements U.V. confirmant le rôle de ces deux enzymes dans la synthèse de composés intervenant dans la protection des tissus foliaires. Il est connu que les voies métaboliques secondaires sont soumises à une régulation dépendante de l'intensité lumineuse tout au long de la journée et il a été montré que l'expression de la majorité des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes est orchestrée par le cycle circadien. Une étude récente sur l'horloge biologique d'*Arabidopsis*, a permis de montrer que la transcription de 6% des gènes étudiés (8000 au total) répond au cycle circadien (Harmer *et al.*, 2000). 23 de ces gènes codent pour des enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes et d'autres pour des facteurs de transcription de type MYB (voir paragraphe 1.6.2).

D'autre part, une augmentation des activités cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD) et cinnamoyl-CoA réductase (CCR) a été décrite dans des suspensions cellulaires d'épicéa traitées par un éliciteur fongique (Messner et Boll, 1993) en corrélation avec la présence de composés de type lignine.

D'autres gènes impliqués dans la métabolisation des phénylpropanoïdes ont été identifiés, en particulier celui de la TOGT, une glucosyltransférase de tabac, induite suite à l'infection ou à une application exogène d'un éliciteur ou d'acide salicylique. Cette glucosyltransférase est impliquée dans la glucosylation de dérivés phénylpropanes, tels que la scopolétine, dont la synthèse est stimulée lors des réactions de défense (Fraissinet-Tachet *et al.*, 1998; Chong *et al.*, 2002).

En règle générale, l'augmentation de l'activité des enzymes décrites est corrélée à une accumulation des transcrits correspondants (Dixon et Paiva, 1995). Cette régulation de type transcriptionnel sera discutée paragraphe 1.6.

1.5.2 Identification et fonctions des dérivés phénylpropanes produits dans les situations de stress

L'induction concomitante de diverses enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes s'accompagne de la synthèse de nombreux composés impliqués dans la défense contre des agents pathogènes (Dakora et Phillips, 1996). Ce rôle antimicrobien a clairement été démontré par l'expression hétérologue d'un gène de stilbène synthase (SS) de vigne dans le tabac puisque les tabacs transgéniques présentent une résistance accrue à *Botrytis cinerea* (Hain *et al.*, 1993). D'autres phénols issus du métabolisme des phénylpropanoïdes s'accumulent au niveau des parois végétales lors des réponses de défense comme les polymères phénoliques qui peuvent participer au confinement de l'agent pathogène à son site d'infection (Nicholson et Hammerschmidt, 1992). Un certain nombre d'observations et de corrélations sont en faveur de ce rôle mais la démonstration d'une telle fonction n'a jamais été apportée.

L'estérification d'acides férulique et *p*-coumarique aux parois permet d'établir des liaisons à l'intérieur de la matrice polysaccharidique mais aussi des liens entre les polysaccharides et la lignine (**Fig. 11 et 12**) (Iiyama *et al.*, 1994). Ces liaisons rendraient les composés de la paroi moins accessibles aux enzymes de dégradation des agents pathogènes. L'analyse cytologique de l'interaction de la tomate avec *Fusarium oxysporum* révèle des modifications physiques de la paroi lorsque les tissus sont prétraités avec un éliciteur. Ces modifications se traduisent par des dépôts importants de callose et de composés phénoliques et s'accompagnent de l'arrêt de la croissance de l'hyphe (Benhamou et Lafontaine, 1995). Il a également été montré que des suspensions cellulaires de persil traitées avec un éliciteur de *Phytophthora sojae* incorporent dans leur paroi les acides *p*-coumarique et férulique (Franke *et al.*, 1998). De même, l'acide diférulique s'accumule dans des feuilles d'avoine inoculées avec un agent fongique. Ce dimère interviendrait dans le renforcement de la paroi végétale (Ikegawa

et al., 1996). Une enzyme à activité tyramine N-hydroxycinnamoyltransférerase (THT), a été clonée chez le tabac et la pomme de terre (Farmer *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 1999). L'activité THT est induite en réponse à la blessure et lors d'une infection par le VMT ou *Phytophthora*. Cette enzyme accepte différents esters de CoA pour substrat et permettrait de renforcer la paroi cellulaire en estérifiant les acides férulique et *p*-coumarique sur les fonctions amines des tyrosines pariétales (Fleurence et Negrel, 1989). Tous ces résultats montrent l'importance des phénols - notamment l'acide férulique - dans l'élaboration d'une barrière mécanique résistante aux enzymes de dégradation des pathogènes. Le rôle des composés phénoliques est moins clair dans les interactions avec les virus. La quantité de lignine augmente dès 24 heures après infection de feuilles de haricot avec le Virus de la Nécrose du Tabac (VNT) (Kimmins et Wuddah, 1977). L'induction de la PAL, de l'OMT et de la C4H dans les feuilles de tabac infectées par le VMT (Legrand *et al.*, 1976a) conforte l'hypothèse d'un rôle des composés phénoliques dans la résistance antivirale. L'estérification de l'acide férulique ou d'autres phénols aux polysaccharides de la paroi au niveau des plasmodesmes pourrait être un des mécanismes permettant de ralentir la diffusion du virus de cellule à cellule.

Dans certaines interactions hôte/pathogène, la lignine s'accumule au site d'infection et peut participer à la mise en place de la barrière mécanique. Des études sur le concombre montrent qu'après élicitation avec des oligogalacturonides, la lignine formée est principalement composée d'unités H (Robertsen et Svalheim, 1990). De même, après infection de feuilles de blé, une synthèse accrue de lignine est observée au site de pénétration des champignons *Botrytis cinerea* et *Mycosphaerella pinodes*. La paroi est ainsi rendue plus résistante à la macération et permet l'arrêt de la croissance du champignon (Ride, 1975). De même, l'élicitation de suspensions cellulaires d'épicéa s'accompagne de l'accumulation de composés réagissant positivement avec le phloroglucinol-HCl et ayant un spectre infrarouge identique à celui de la lignine (Messner et Boll, 1993). L'analyse chimique de la lignine par thioacidolyse a permis d'identifier un polymère ramifié, riche en unités H, et présentant des similarités avec la lignine formée au stade précoce du développement et au sein du bois de compression (Lange *et al.*, 1995). Ces résultats sont en accord avec ceux de Burlat et Coll. (1997) qui montrent que chez le peuplier ou le blé, la lignine non condensée (riche en unités G-S) est beaucoup plus sensible à la dégradation par *Phlebia radiata* que la lignine hautement condensée riche en unités H. Après infection, le dépôt de lignine néosynthétisée enrichie en unités H pourrait rendre la paroi végétale plus résistante à la dégradation.

L'importance du métabolisme des phénylpropanoïdes dans les mécanismes de résistance aux agents pathogènes ou encore dans la tolérance des tissus aux rayonnements U.V. a été démontrée à travers les nombreuses plantes transgéniques ou mutants affectés dans la synthèse des phénylpropanoïdes. Un certain nombre de ces points sont présentés dans le paragraphe 2.5.

1.6 Les mécanismes de régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes

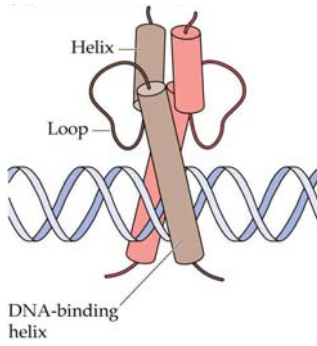
De nombreux composés phénylpropanes et dérivés, comme les anthocyanes, les isoflavonoïdes, les esters d'acide sinapique et caféique ou encore la lignine jouent des rôles physiologiques variés et s'avèrent essentiels tout au long du développement de la plante.

De plus, comme cela a déjà été mentionné, le métabolisme des phénylpropanoïdes est activé par divers stress environnementaux tels que les rayonnements U.V., la blessure ou l'attaque par des agents pathogènes (Dixon et Paiva, 1995) et les composés synthétisés s'accumulent souvent dans des tissus spécialisés. La majorité des gènes impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes a été caractérisée. Leur régulation a été démontrée comme étant essentiellement transcriptionnelle (Dixon et Paiva, 1995). Les enzymes sujettes à régulation interviennent à la fois dans la voie centrale des phénylpropanoïdes (PAL, CHS), mais également dans des branches plus spécifiques de la voie conduisant par exemple à la synthèse d'isoflavonoïdes (CHI) ou à la lignine (CAD, CCR). De plus, l'induction de la transcription de certains gènes (PAL et CHS) se fait de façon très précoce tandis que d'autres présentent une stimulation plus tardive (OMT) indiquant l'implication de signaux multiples (Dixon et Paiva, 1995). L'existence d'une telle organisation est certainement nécessaire pour faciliter la régulation des diverses voies du métabolisme des phénylpropanoïdes en réponse à différents signaux environnementaux ou développementaux. Le contrôle transcriptionnel de l'expression de plusieurs gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes a été démontré par de multiples approches dont voici quelques exemples. Ceux-ci seront illustrés dans un premier temps par la caractérisation d'éléments *cis* régulateurs, puis dans un second temps par les facteurs de transcriptions pouvant reconnaître ces régions promotrices. L'activité de certaines protéines, comme la PAL, sont également régulées par des modifications post-transcriptionnelles.

1.6.1 Les éléments *cis* régulateurs

Il semble que le contrôle de la transcription des gènes biosynthétiques constitue un mécanisme de régulation majeur de la production des métabolites secondaires. Les éléments régulateurs agissant en *cis* ont été identifiés au sein des promoteurs de plusieurs gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes, comme par exemple le gène de la PAL (Lois *et al.*, 1989; Ohl *et al.*, 1990; Logemann *et al.*, 1995), de la 4CL (Douglas *et al.*, 1991; Hauffe *et al.*, 1993), de la CAD (Feuillet *et al.*, 1995), de la CCoAOMT (Grimmig et Matern, 1997), de la C4H (Bell-Lelong *et al.*, 1997; Mizutani *et al.*, 1997), de la CCR (Lacombe *et al.*, 2000) ou encore le gène de la COMT II (Toquin *et al.*, 2003). Parmi ces éléments *cis*-régulateurs, encore appelés « boîtes », un certain nombre d'entre eux sont conservés au sein des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes. On trouve notamment les boîtes P, A, L et H (Lois *et al.*, 1989; Logemann

Hélice-boucle-Hélice



Doigt de zinc

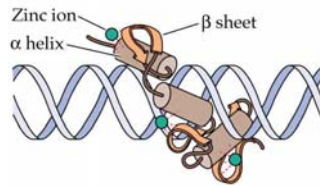


Figure 41. Motifs protéiques de facteurs de transcription reconnaissant l'ADN. (Buchanan *et al.*, 2001).

Motif Hélice-boucle-Hélice présent dans les facteurs de transcription de type MYB.

Motif en doigt de zinc présent dans les facteurs de transcription de type LIM.

et al., 1995). Ces éléments ont été initialement identifiés dans le promoteur PAL de persil; les séquences nucléotidiques correspondantes constituent des sites d'interaction avec des protéines en réponse à des éliciteurs fongiques (Lois *et al.*, 1989), mais également à la lumière blanche et aux rayonnements U.V. (Bell-Lelong *et al.*, 1997; Whitbred et Schuler, 2000). Un autre élément appelé la boîte E est nécessaire pour la réponse du gène codant pour la CCoAOMT à un traitement par un éliciteur (Grimmig et Matern, 1997). Les boîtes G contrôlent l'activation de plusieurs gènes dont l'expression est induite par de nombreux stress (Giuliano *et al.*, 1988; Menkens *et al.*, 1995). Plus récemment, Lacombe et Coll. (2000) ont identifié sur le promoteur CCR d'*Eucalyptus gunni* des éléments *cis* régulateurs nécessaires et suffisants pour une expression spécifique du gène dans les tissus vasculaires de la tige.

1.6.2 Les facteurs de transcription

Parmi les facteurs de transcription jouant un rôle clef dans la régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes, on trouve essentiellement des protéines appartenant à la famille des gènes *MYB* (Jin et Martin, 1999) et celles appartenant à la famille des gènes *LIM* (Kawaoka et Ebinuma, 2001). Par exemple, des motifs présents sur le promoteur de la PAL sont reconnus à la fois par des protéines MYB et LIM et régulent l'expression de la PAL de façon tissu spécifique (Kawaoka *et al.*, 2000).

Les facteurs MYB, identifiés chez les vertébrés, les insectes, les plantes, les champignons et les virus, représentent une famille de protéines possédant un domaine de fixation à l'ADN caractéristique, le domaine MYB, un motif hélice-boucle-hélice (**Fig. 41**). Contrairement aux animaux, les plantes possèdent une sous-famille de protéines MYB caractérisée par la présence de deux motifs MYB, les répétitions R2 et R3 (Stracke *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis*, la famille MYB compte 125 gènes. Pour la majorité de ces 125 gènes, aucune donnée fonctionnelle n'est disponible. Mais grâce à différentes approches systématiques, il a été possible ces dernières années d'attribuer des fonctions physiologiques à un nombre croissant de protéines R2R3-MYB, notamment dans la régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes (Kranz *et al.*, 1998; Meissner *et al.*, 1999). La surexpression d'un de ces facteurs, *PAP1* (*Production of Anthocyanin Pigment1*), conduit à l'accumulation d'anthocyanines et d'autres composés phénoliques tels que la lignine (Borevitz *et al.*, 2000). Par contre, la mutation du gène codant pour le facteur AtMYB4 augmente la synthèse d'esters d'acide sinapique rendant ces plantes plus tolérantes aux rayonnements U.V. (Jin *et al.*, 2000; Hemm *et al.*, 2001). Ces premières expériences montrent que la flexibilité de la régulation spatio-temporelle de l'expression des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes peut se faire grâce à des facteurs de transcription de type R2R3-MYB, aux propriétés d'activation (exemple : PAP1) ou de répression (exemple : AtMYB4) de la transcription. Des études réalisées sur d'autres espèces végétales telles que le tabac, le pétunia, le maïs, la gueule-de-loup ont également permis de

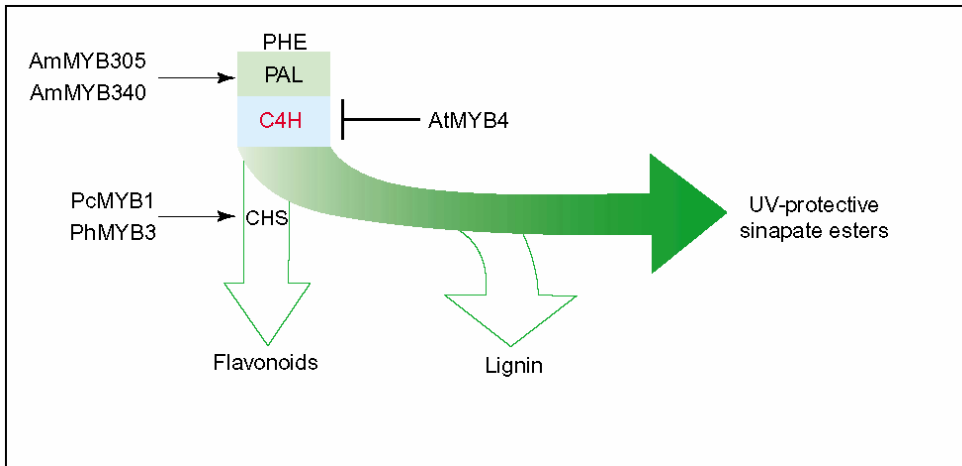


Figure 42. Exemples de quelques facteurs de transcription de type MYB régulant l'expression de gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes. (Hemm *et al.*, 2001).

AmMYB305 et AmMYB340 (*Antirrhinum majus*), régulateurs positifs de la PAL.
PcMYB1 (*Petroselinum crispum*) et PhMYB3 (*Petunia hybrida*), régulateurs positifs de la CHS.
AtMYB4 (*Arabidopsis*), régulateurs négatif de la C4H, module la production de sinapoyl-malate.

montrer le rôle de ces facteurs de transcription dans la régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes (**Fig. 42**) (Paz-Ares, 1987; Grotewold *et al.*, 1994; Sablowski *et al.*, 1994; Moyano *et al.*, 1996; Tamagnone *et al.*, 1998a, b) et de la voie de biosynthèse du tryptophane (Bender et Fink, 1998). Des études biochimiques ont permis de montrer que certains de ces facteurs de transcription agissaient bien au niveau transcriptionnel, notamment pour le gène *PAL* (Moyano *et al.*, 1996), *CHS* (Solano *et al.*, 1995) et *C4H* (Jin *et al.*, 2000). Les séquences nucléotidiques cibles avec lesquelles les protéines R2R3-MYB interagissent sont caractéristiques comme la boîte P (Sablowski *et al.*, 1994; Uimari et Strommer, 1997).

Les facteurs de transcription R2R3-MYB sont également impliqués dans le contrôle de la morphogenèse et la croissance cellulaire, la médiation d'actions hormonales ou encore dans la réponse des plantes à des stress abiotiques ou à des attaques par des agents pathogènes (Martin et Paz-Ares, 1997; Jin et Martin, 1999; Stracke *et al.*, 2001).

Il a également été démontré que la régulation fine de métabolismes secondaires faisait intervenir des interactions physiques entre certains facteurs de transcription. Prenons l'exemple de la voie de biosynthèse des anthocyanines qui est tissu-spécifique et contrôlée par la combinaison et l'interaction de deux types de facteurs de transcription appartenant à deux familles de gènes différentes (Grotewold *et al.*, 2000) : la famille « bHLH » code pour des facteurs de transcription présentant des homologies avec la protéine de type Basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) codée par le gène de vertébré proto-oncogène *c-MYC* et la famille « MYB » présentée plus haut (Gantet et Memelink, 2002). L'importance de ces interactions entre différents partenaires contrôlant la transcription a récemment été mise en évidence chez le pétunia. Une nouvelle protéine bHLH, AN1 (*anthocyanin 1*), a été caractérisée et il a été montré qu'elle pouvait directement activer la transcription de gènes intervenant dans la biosynthèse des anthocyanines (Spelt *et al.*, 2000). Mais, il a également été démontré que AN1 n'était pas suffisant pour la biosynthèse des anthocyanines dans les organes floraux et que d'autres activateurs transcriptionnels à domaines MYB s'avéraient nécessaires (Spelt *et al.*, 2000).

D'autres facteurs transcriptionnels impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et plus précisément de la lignine ont été caractérisés. Il s'agit par exemple d'une protéine de tabac possédant deux domaines LIM (Kawaoka *et al.*, 2000; Kawaoka et Ebinuma, 2001). Les membres de la famille des protéines LIM contiennent un motif en doigt de zinc (**Fig. 41**) (Taira *et al.*, 1995). La protéine de tabac est capable de reconnaître une séquence nucléotidique comparable à celle reconnue par les protéines MYB (la boîte P). L'expression du gène codant pour ce facteur LIM est forte au niveau de la tige et est induite transitoirement par la blessure (Kawaoka *et al.*, 2000). La répression de ce gène conduit à une diminution de l'expression de plusieurs gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes tels que la *PAL*, la *4CL* et la *CAD* et à une réduction de 20% du contenu en lignine.

1.6.3 Autres mécanismes de régulation

En plus d'un contrôle de type transcriptionnel, il existe d'autres niveaux de régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes. Par exemple, il a été mis en évidence l'importance d'une régulation post-transcriptionnelle, notamment avec la notion d'inactivation après induction de la PAL. Cette régulation post-transcriptionnelle de l'activité PAL se fait par des phénomènes de phosphorylation de la protéine (Bolwell, 1992). Ces réactions font intervenir des protéines kinases de type « Calcium Dependent Protein Kinase » (CDPK) (Allwood *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2001; Allwood *et al.*, 2002).

Des mécanismes de type rétrocontrôle métabolique ont également été démontrés lors de l'accumulation ou la disparition de certains produits phénoliques à la suite de l'inhibition d'une étape enzymatique. Par exemple, des travaux réalisés au laboratoire ont permis de montrer que l'inhibition de la COMT I dans des tabacs transgéniques se répercutait sur l'expression de la CCoAOMT ou que l'inhibition de la COMT I modifiait l'expression de la CCR (Pinçon, 1999). Chez la luzerne, la surexpression d'une isoflavone *O*-méthyltransférase conduit à une élévation de la synthèse des phytoalexines de type isoflavonoïde et de la résistance aux agents pathogènes mais également à une augmentation de la stimulation des gènes *PAL* et *C4H* (He et Dixon, 2000).

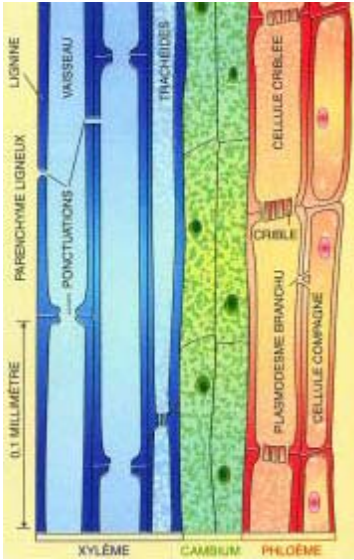
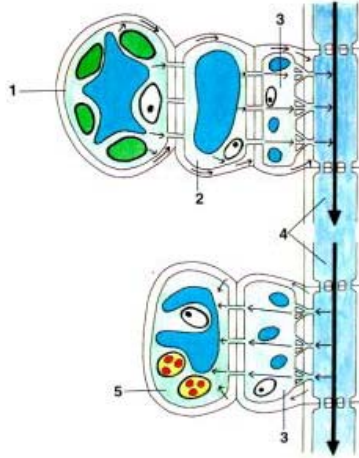
Récemment, la découverte du rôle des micros ARNs en tant qu'éléments régulateurs de la transcription des ARNm, notamment de gènes intervenant dans le développement de la plante, laisse entrevoir d'autres voies de régulation (Kidner et Martienssen, 2003; Kasschau *et al.*, 2003). Une étude récente des micros ARNs d'*Arabidopsis* a montré que certains d'entre eux présentaient une forte homologie de séquence avec des facteurs de transcription et auraient notamment la capacité de réguler des protéines régulatrices de type MYB (Jones, 2002).

2. La lignine

2.1 Rôle de la lignine

La lignine est un polymère complexe constitué uniquement de composés phénylpropanes. Elle est présente exclusivement chez les plantes vascularisées à savoir les Ptéridophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes. Des polymères phénoliques autres que la lignine ont été identifiés chez les Bryophytes (mousses), possédant probablement les mêmes propriétés et les mêmes fonctions que la lignine (Erickson et Miksche, 1974; Wilson *et al.*, 1989).

La lignine est localisée dans les tissus conducteurs comme le xylème, le phloème mais aussi dans des tissus de soutien comme le sclérenchyme. La lignine a ainsi un rôle de support mécanique en assurant la rigidité des cellules. Du fait de sa structure riche en noyaux phényles et en chaînes carbonées, elle rend également les cellules imperméables à l'eau et

A**B**

- 1 : parenchyme lacuneux
- 2 : parenchyme du phloème
- 3 : cellules compagnes
- 4 : tubes criblés
- 5 : tissu de réserve

Figure 43. Représentation schématique des tissus conducteurs.

(Illustrations : http://intra-ibmp.u-strasbg.fr/sg/microscopie/cvme/mat_cyto/catalogue3.html)

A: coupe longitudinale d'un système vasculaire comprenant de gauche à droite le parenchyme, les vaisseaux et les trachéides du xylème (bleu), le cambium (vert) puis les cellules criblées et compagnes du phloème (rouge).
B: coupe longitudinale et zoom sur les tissus phloémiens; présentation des échanges et des voies de communication entre les cellules parenchymateuses, compagnes et les tubes criblés via les plasmodesmes et les pores.

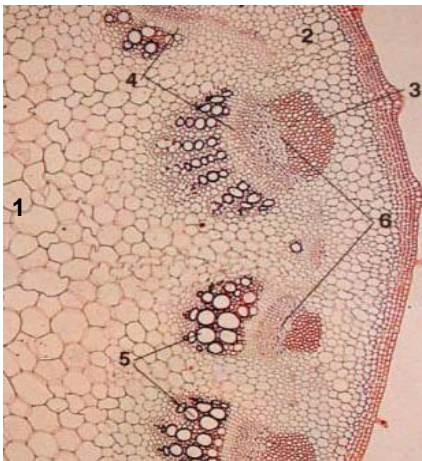


Figure 44. Coupe transversale d'une tige de tournesol.

(Illustration : http://intra-ibmp.u-strasbg.fr/sg/microscopie/cvme/mat_cyto/catalogue5.html)

- 1 : moelle
- 2 : cortex
- 3 : fibres de phloème
- 4 : cambium
- 5 : xylème
- 6 : phloème

permet donc le transport de solutés dans toute la plante par les tissus conducteurs. La lignine joue également un rôle dans les mécanismes de défense des plantes. Elle forme de façon constitutive une barrière mécanique et peut être aussi synthétisée *de novo* (Vance *et al.*, 1980).

La quantité et la composition de la lignine varient en fonction de l'appartenance taxonomique, de l'espèce végétale, des tissus considérés, des types cellulaires (et même de la partie de la paroi cellulaire considérée), du stade de développement, des conditions environnementales et des facteurs de stress. La composition et la quantité de lignine synthétisée varient également en fonction de la période de l'année et des contraintes physiques auxquelles peut être soumise la plante telles que le vent ou la rencontre d'un obstacle. Ces dépôts constituent ce qu'on appelle les bois de réaction (Côté, 1977).

2.2 Les tissus conducteurs et le processus de lignification

2.2.1 Le système vasculaire

Les plantes vasculaires sont caractérisées par la présence de deux types de tissus spécialisés. Le xylème conduit la sève brute, contenant l'eau et les sels minéraux, des racines vers les feuilles. Le phloème conduit la sève élaborée, solution de substances organiques issues de la photosynthèse, des organes sources vers les organes puits.

Le xylème est constitué de différents types de tissus :

- les éléments conducteurs, regroupés sous le terme de « tracheary elements » ou TE, et caractérisés par le fait qu'ils sont constitués de cellules mortes. Ces éléments conducteurs sont formés par les trachéides, cellules allongées présentant de nombreuses ponctuations et les vaisseaux, longs tubes constitués par l'assemblage de cellules courtes à parois lignifiées et perforées.
- les cellules parenchymateuses, éléments vivants, pouvant servir de réserve ou de voie de sécrétion vers les vaisseaux. Ces cellules parenchymateuses bordant les vaisseaux sont plus connues sous le nom de « ray cells » (**Fig. 43A**).

Le phloème est un système de transport formé uniquement de cellules vivantes. Les éléments conducteurs sont des cellules allongées, énucléées, sans vacuole, communiquant entre elles par des pores. On parle de cellules ou tubes criblés. Les tubes criblés sont bordés par des cellules compagnes, elles-mêmes en contact avec des cellules parenchymateuses ou des tissus de réserves (**Fig. 43A et B**).

Chez les Dicotylédones, le système conducteur primaire est habituellement disposé en cercle autour de la moelle (**Fig. 44**). Chez la majeure partie des ces plantes, les cellules du xylème et du phloème sont issues d'un tissu indifférencié appelé cambium fasciculaire qui sépare le xylème et le phloème primaire. Si un épaississement secondaire apparaît, les faisceaux de cambium se raccordent et forment l'anneau continu de cambium libéro-ligneux.

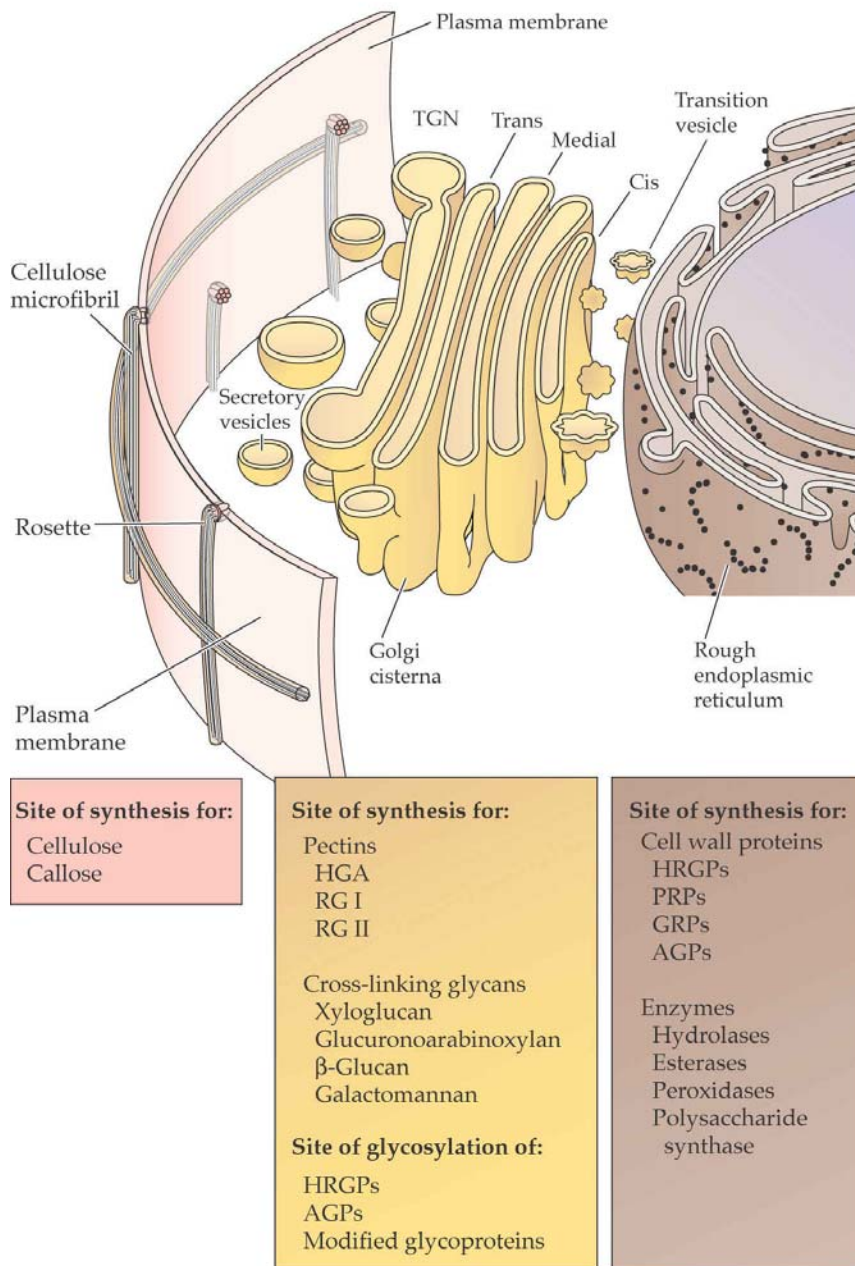


Figure 45. Présentation schématique des différents lieux de synthèse des composants de la paroi cellulaire végétale. (Buchanan *et al.*, 2001).

Cytoplasme : synthèse des protéines pariétales et des enzymes de biosynthèse de la future matrice extracellulaire.

Appareil de Golgi : synthèse des pectines, formation de liaisons inter et intramoléculeaires entre des molécules d'oses et maturation des protéines.

Membrane plasmique : synthèse de la cellulose et de la callose.

Paroi : polymérisation oxydative de la lignine.

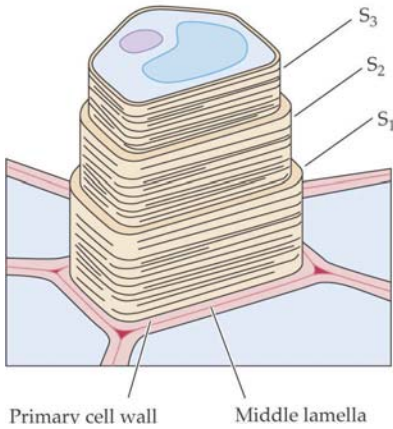
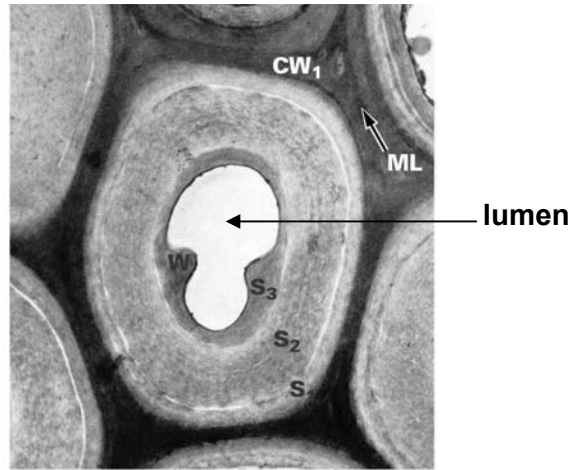
A**B**

Figure 46. Épaississement secondaire d'une paroi cellulaire végétale : dépôt de différentes couches S₁, S₂ et S₃. (Buchanan *et al.*, 2001).

A : la lamelle moyenne et la paroi primaire sont synthétisées en premier et constituent les couches les plus externes. Puis les couches S₁, S₂ et S₃ vont constituer la paroi secondaire.

B : ce dépôt secondaire est observé chez des cellules spécialisées nécessitant une forte résistance mécanique, comme par exemple les fibres présentes dans la tige. Cet épaississement prend fin lorsque la cellule meurt ; la désintégration du protoplasme laisse place à un espace appelé lumen (CW₁: paroi primaire; ML : lamelle moyenne).

Cette zone méristématique va produire le xylème secondaire vers l'intérieur (vers la moelle) et le phloème secondaire vers l'extérieur (vers le cortex) (Bowes, 1998). Les cellules spécialisées du xylème et du phloème présentent des parois cellulaires épaisses et riches en lignine.

2.2.2 Le processus de lignification de la paroi cellulaire végétale

Le dépôt et la modification des composés présents dans la paroi cellulaire végétale jouent des rôles essentiels au cours de la croissance et du développement de la plante (Carpita et Gibeaut, 1993). En effet, on peut distinguer deux types de parois cellulaires chez les végétaux supérieurs : les parois primaires et secondaires qui sont formées à différents stades de croissance de la cellule.

Les parois primaires sont mises en place pendant la croissance cellulaire. Elles sont nécessaires à la fois pour la stabilité mécanique des cellules et confèrent une extensibilité suffisante pour permettre l'expansion cellulaire sans risque de rupture de la membrane plasmique, sous l'action de la pression de turgescence. Ces parois primaires sont principalement constituées de polysaccharidiques, à savoir la cellulose, les hémicelluloses et les pectines, interagissant les unes avec les autres pour former ce qu'on appelle la matrice extra-cellulaire. Les polymères d'hémicellulose et de pectine sont synthétisés dans l'appareil de Golgi, alors que la cellulose est générée au niveau de la membrane plasmique sous forme de microfibrilles (**Fig. 45**). Les parois cellulaires contiennent également des centaines de protéines différentes (HRGP, PRP, GRP). Ces protéines ont des fonctions structurales et interviennent dans des phénomènes dynamiques de renouvellement de la paroi cellulaire. A ce stade de croissance cellulaire le dépôt de lignine est très discret.

Le dépôt de lignine est associé à la formation de la paroi secondaire, c'est-à-dire au stade où la cellule a atteint sa taille définitive. Lorsque la croissance cellulaire est stoppée, les propriétés mécaniques de la paroi changent grâce au dépôt d'une nouvelle matrice essentiellement composée de cellulose et d'hémicellulose, et imprégnée de lignine. La paroi secondaire est plus épaisse, plus résistante aux contraintes mécaniques et plus hydrophobe grâce à l'enrichissement en composés phénoliques (Bolwell, 1988; Iiyama *et al.* 1994). Ces propriétés physico-chimiques sont notamment nécessaires aux cellules spécialisées des tissus conducteurs, le xylème et le phloème.

La paroi secondaire est répartie en trois couches S1, S2, et S3, cette dernière n'étant pas toujours présente (**Fig. 46**) (Fengel et Wegener, 1984). Le dépôt de lignine est un processus ordonné. Il se fait en trois étapes distinctes toujours précédées par le dépôt de polysaccharides (Terashima *et al.*, 1988) qui peuvent jouer un rôle dans l'organisation de la lignine notamment en imposant une orientation préférentielle du noyau aromatique dans la matrice (Atalla et Agarwal, 1985). Le dépôt débute tout d'abord dans la paroi S1 au niveau de la lamelle moyenne et dans les coins des cellules. Puis la lignification se poursuit dans la paroi S2 après

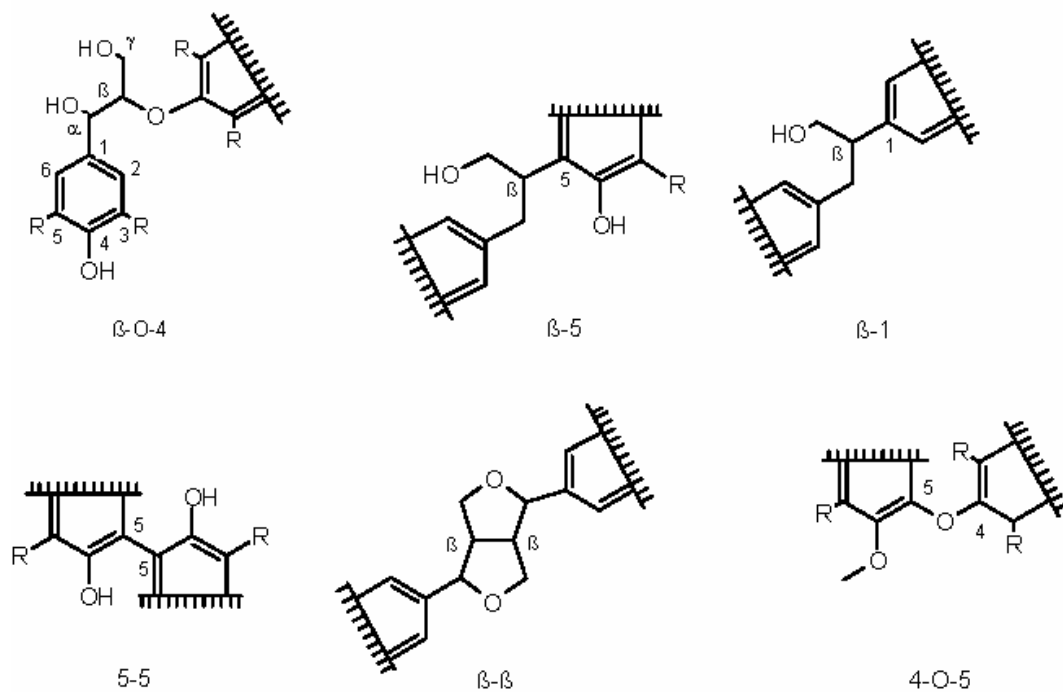


Figure 47. Liaisons intermonomériques trouvées dans la lignine.

Liaisons labiles : β -O-4 (liaisons éther).

Liaisons résistantes : β -5 (liaisons phényl-coumaranes), β -1 (liaisons diarylpropanes), 5-5 (liaisons biphényles), β - β (liaisons résinols) et 4-O-5 (liaisons diphényl éther).

dépôt de la cellulose et de l'hémicellulose. Enfin, le dépôt de lignine le plus important, quantitativement, se produit pendant la formation de la couche S3, après le dépôt des microfibrilles de cellulose.

Ce dépôt de lignine se fait de façon séquentielle et non homogène au cours du temps. En effet, la lignine est un polymère hétérogène composé de trois unités structurales différentes (H, G et S) et nous allons voir comment, en faisant varier la proportion et la quantité de ces composés, la plante peut synthétiser plusieurs types de lignine.

Mais tout d'abord, je vais présenter de façon plus précise la nature chimique de la lignine.

2.3 Nature chimique et hétérogénéité des polymères de lignine

2.3.1 Les monolignols

La synthèse de la lignine se fait par la polymérisation déshydrogénative de trois alcools hydroxycinnamiques différents, encore appelés monolignols (**Fig. 38**). Ces monolignols ont tous le même squelette carboné C6-C3 (**Fig. 4**), dérivant de la Phe, mais différent par leur degré de méthylation. L'alcool *p*-coumarylique, précurseur des unités *p*-hydroxyphényles (H), est non méthoxylé, l'alcool coniférikique, précurseur des unités gaïacyles (G), est monométhoxylé et l'alcool sinapylique, précurseur des unités syringyles (S), est diméthoxylé (**Fig. 5**). Ces monolignols sont issus respectivement de la réduction des CoA thiolesters d'acide *p*-coumarique, férulique et sinapique (**Fig. 5 et 34**).

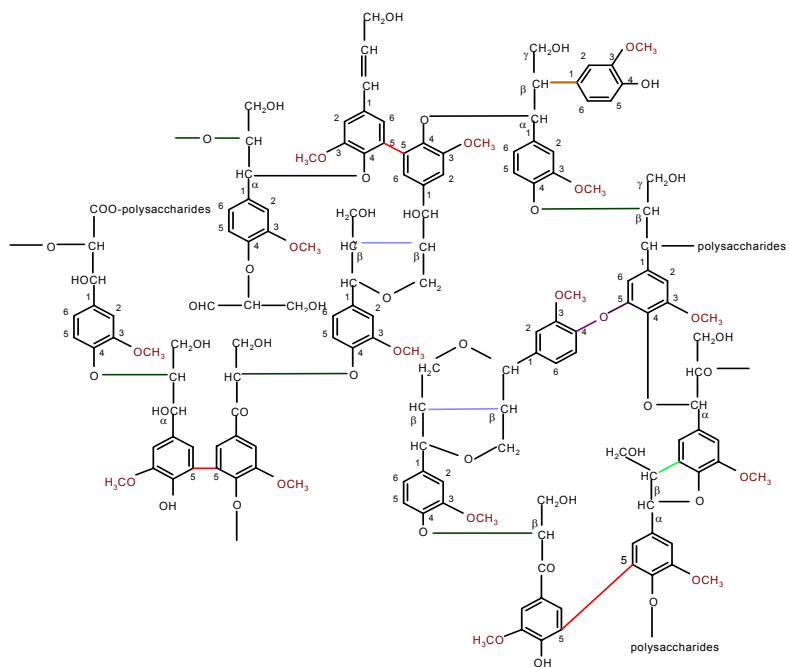
2.3.2 Les liaisons chimiques

Au sein de ce polymère complexe dont la structure se présente comme un réseau en trois dimensions, les unités monomériques sont reliées entre elles par des liaisons de type éther (C-O-C) et carbone – carbone.

Les liaisons intermonomériques les plus fréquentes sont les liaisons de types éthers β -O-4. Ce sont des liaisons labiles, non condensées (**Fig. 47**). Elles sont caractéristiques des bois d'Angiospermes et peuvent représenter 60% des liaisons entre unités C6-C3 (Monties, 1989). En effet, la lignine d'Angiosperme est riche en unité S, dont les carbones C3 et C5 sont indisponibles pour établir des liaisons car méthoxylés; seule la fonction phénolique en position C4 reste libre.

Les autres liaisons assurant également la cohésion de la macromolécule sont de types carbone - carbone (β -5; β -1; β - β ; 5-5) (**Fig. 47**). On parle dans ce cas de liaisons condensées car plus résistantes à la dégradation. Elles sont retrouvées surtout chez les Gymnospermes qui

A



B

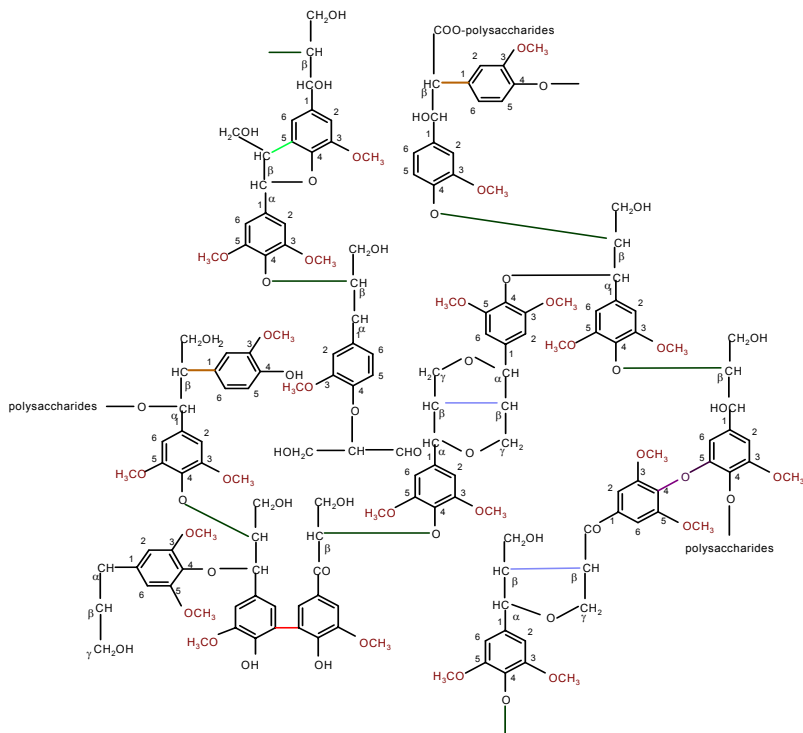


Figure 48. Schéma simplifié de la lignine.

A : Lignine de Gymnosperme.

B : Lignine d'Angiosperme.

Ceci est une représentation schématique ne tenant pas compte de la fréquence des différents types de liaisons intramoléculeaires. Les polysaccharides pariétaux sont liés aux monomères de lignine par des liaisons esters (avec les groupements hydroxyles des carbones α et γ des chaînes latérales) ou par des liaisons éthers (avec le groupement hydroxyle en position 4). En vert clair sont indiquées les liaisons phényl-coumaranes (β -5), en bleu, les liaisons résinols (β - β), en rouge, les liaisons biphényles 5-5, en vert foncé, les liaisons β -O-4, et en ocre, les liaisons diarylpropanes (β -1).

présentent une forte proportion d'unités G, où le carbone C5 peut être engagé dans une liaison C-C.

La lignine est constituée d'unités phénoliques liées entre elles mais elle peut également établir des liaisons avec d'autres macromolécules telles que les polysaccharides, d'autres HCAs (voir paragraphe 1.2.3) par des liaisons esters ou éthers (**Fig. 12**) ou encore être liée aux glycoprotéines et aux tannins (Monties, 1989).

Comme cela a été mentionné plus haut, la lignine est caractérisée par une grande variabilité de sa quantité et de sa composition suivant les espèces végétales. Au sein d'une même plante, l'hétérogénéité de la lignine est régulée pendant la synthèse de la paroi secondaire. Au cours de la lignification, le dépôt des sous-unités est séquentiel, et chez les Angiospermes, les unités H et G sont déposées avant les unités S.

2.3.3 Hétérogénéité des polymères de lignine

Ainsi, derrière le terme "lignine" se cache un ensemble de polymères dont la structure est déterminée par différents paramètres qui vont conditionner sa nature (Baucher *et al.*, 1998).

En effet, la lignine des Ptéridophytes et des Gymnospermes (**Fig. 48A**) est essentiellement composée d'unités G tandis que la lignine d'Angiospermes (**Fig. 48B**) contient des unités G et des unités S, la lignine de Graminées contenant des unités H en quantité plus importante (Monties, 1989; Baucher *et al.*, 1998). D'autre part, le dépôt séquentiel des unités est responsable d'une différence de composition au niveau cellulaire, la lamelle moyenne étant plus riche en unités H, et la paroi secondaire étant plus riche en unités G chez les Gymnospermes par exemple (Baucher *et al.*, 1998). La composition monomérique peut également varier au sein de la paroi d'une même cellule. En effet, Joseleau et Ruel (1997) ont montré, par une technique d'immuno-marquage, que dans les entrenœuds de maïs, la synthèse des unités H précède celle des unités G et S. Une hétérogénéité dans la nature des liaisons liant les monomères de lignine de métaxylème de blé a été observée (Burlat *et al.*, 1997) : la paroi de ces plantes présente des couches de lignine condensée alternées avec des couches de lignine moins condensée.

La différence de composition entre Angiospermes et Gymnospermes pourrait résulter de la différence de spécificité de substrat des enzymes. En effet, les Gymnospermes sont caractérisés par une lignine riche en unités G et généralement, la COMT de Gymnosperme n'accepte pas l'acide 5-OH-férulique (Higuchi *et al.*, 1977). Seule l'AEOMT de pin a été identifiée comme acceptant l'acide 5-OH-férulique (Li *et al.*, 1997). De même, l'acide ou l'aldéhyde sinapique ne sont pas acceptés par la 4CL (voir paragraphe 1.3.6) et la CAD (voir paragraphe 1.4.2) de Gymnosperme. Quant à la F5H, les données actuelles ne permettent pas de savoir si l'enzyme est présente ou non chez les Gymnospermes mais chez les Angiospermes,

cette enzyme semble constituer une étape de régulation (Meyer *et al.*, 1998). D'autre part, chez les Angiospermes, le rôle de la COMT dans la synthèse des unités S a clairement été mis en évidence dans le mutant naturel de maïs *bm3* touché dans la COMT (Vignols *et al.*, 1995), et dans des plantes transgéniques inhibées pour la COMT (Atanassova *et al.*, 1995; Van Doorselaere *et al.*, 1995). Ces plantes se caractérisent par une forte diminution des unités S.

D'autre part, l'hétérogénéité de la lignine au sein d'une même paroi peut s'expliquer par l'existence de familles de protéines catalysant les mêmes réactions. En effet, il existe de nombreuses isoformes de la PAL, de la 4CL et de la CAD qui ont des spécificités de substrats différentes et dont la régulation spatio-temporelle pourrait varier suivant les tissus (Campbell et Sederoff, 1996). L'hétérogénéité de la lignine pourrait également résulter de la régulation différentielle des enzymes responsables du transport et de la polymérisation, telles les glucosyltransférases, les β -glucosidases, les peroxydases et les laccases (voir paragraphes 1.4.3 et 1.4.4) (Campbell et Sederoff, 1996). Cette régulation pourrait jouer sur le stockage et la disponibilité des unités monomériques et donc sur la quantité et la qualité de la lignine synthétisée.

2.3.4 Analyse chimique de la lignine

Il existe différentes méthodes chimiques pour analyser la lignine. On peut les classer en deux catégories, celles qui permettent de quantifier la lignine et celles qui permettent de déterminer la structure. Deux méthodes sont couramment utilisées. La méthode de quantification dite « Klason » consiste à hydrolyser les polysaccharides pariétaux à l'aide d'acide sulfurique, tout en rendant le polymère de lignine insoluble. Ce matériel recondensé est ensuite séché puis quantifié par son poids.

Quant à la structure de la lignine, elle est souvent évaluée par thioacidolyse. Cette approche permet d'identifier par CPG-SM les monomères libérés par la coupure sélective des liaisons intermonomériques non-condensées, de type β -O-4 (Lapierre, 1993). Cette méthode est spécifique des unités de lignine et se montre très sensible. Elle permet de déterminer la proportion des unités G et S (souvent exprimée par le rapport S/G) et la fréquence des liaisons non-condensées. Une analyse supplémentaire des structures dimériques libérées, par exemple par CPG-SM, permet de déterminer les autres types de liaisons intermonomériques (Lapierre *et al.*, 1999).

2.4 Importance économique de la lignine

La majorité du carbone fixé lors de la photosynthèse se retrouve dans la paroi cellulaire à travers l'incorporation des polymères que sont la cellulose, les hémicelluloses, les pectines et la lignine. Ces composés font de la paroi cellulaire végétale la source la plus abondante de

biomasse terrestre et d'énergie renouvelable. La paroi cellulaire végétale et ses composés jouent un rôle important dans la nutrition humaine et animale. Elle constitue également une source de fibres naturelles pour les textiles et la fabrication des pâtes à papier. Pour ces raisons, l'étude de la synthèse de la paroi cellulaire végétale a un intérêt considérable tant du point de vue fondamental qu'appliqué.

Si la lignine est un polymère nécessaire au port vertical des plantes supérieures ainsi qu'au transport des nutriments, eau et hormones via le système vasculaire, elle représente également un atout dans la défense des plantes contre les agents pathogènes. D'autre part, de toutes les composantes du bois, la lignine est celle qui produit le plus d'énergie (Baucher *et al.*, 1998). Ainsi, une teneur accrue en lignine pourrait augmenter le pouvoir calorifique du bois.

Cependant, la présence de lignine a des conséquences néfastes lors de l'utilisation de la biomasse. En effet, la lignine n'étant pas digérée par les ruminants, une alimentation fourragère moins riche en lignine permettrait d'augmenter le rendement énergétique lors de la digestion. Dans l'industrie papetière, la production de pâte à papier nécessite l'élimination de la lignine des fibres de cellulose. La lignine étant très résistante aux processus de dégradation, des traitements drastiques, polluants et coûteux sont alors employés. Une modification de la teneur et/ou de la qualité de la lignine aurait donc des retombées économiques notables. Aussi, de nombreuses équipes se sont intéressées à la biosynthèse de la lignine et à sa modulation par génie génétique. Dans les années 1990, deux projets européens ont vu le jour, les projets OPLIGE (Optimization of Lignin in crops and Industrial plants through Genetic Engineering) et TIMBER (Tree Improvement Based on genetic Engineering) dont le but était d'obtenir des plantes d'intérêt économique à lignine modifiée afin d'améliorer son extractabilité et/ou sa digestibilité. Dans ce cadre, le tabac a servi de plante modèle, les plantes cibles étant le peuplier, l'eucalyptus, la luzerne, la fétuque et le sapin.

Les principaux travaux visant à moduler la voie de biosynthèse de la lignine sont présentés ci-dessous.

2.5 Modulation par génie génétique de la voie de biosynthèse de la lignine

La première observation faisant référence à une modification génétique touchant la biosynthèse de la lignine a été recensée, il y a plus de 70 ans, par Jorgensen. Il décrivait, en 1931, la mutation *brown midrib* (bm1) chez le maïs affectant l'expression de la CAD (Anterola et Lewis, 2002).

Depuis une quinzaine d'années, de nombreux travaux basés sur la transgénèse et visant à moduler la biosynthèse de la lignine ont été menés. Ceci a été rendu possible grâce à l'émergence de la biologie moléculaire et aux progrès considérables réalisés dans le domaine du génie génétique.

Nous avons vu que les monolignols, unités structurales de la lignine, ont pour origine le métabolisme des phénylpropanoïdes. Par conséquent, de nombreuses étapes enzymatiques

peuvent constituer des cibles en vue de modifier la biosynthèse de la lignine. Des résultats ont été obtenus avec pour cibles la PAL, la C4H et la C3H, très en amont de la voie de biosynthèse, ou encore, avec les OMTs, la 4CL et la F5H. Les enzymes plus spécifiquement impliquées dans la biosynthèse de la lignine, à savoir la CCR, la CAD, les peroxydases et laccases ont également fait l'objet d'investigations. Par ailleurs, une perturbation de la voie de biosynthèse de la lignine a également été observée lors d'études réalisées sur les facteurs de transcription ou des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du shikimate.

Pour chacune des enzymes/protéines cible seront considérés :

- les effets sur le développement et la croissance de la plante,
- les conséquences sur la structure des tissus conducteurs et des parois,
- les répercussions sur la teneur et la composition de la lignine synthétisée,
- les impacts éventuels sur d'autres processus physiologiques, tels que la résistance des plantes aux agents pathogènes.

Comme cela a déjà été mentionné dans le paragraphe 2.3.4, les protocoles d'analyse chimique de la lignine sont variés. De manière générale, ils ne permettent pas de déterminer avec précision le contenu ou la nature de la lignine synthétisée, mais plutôt d'établir un ordre de grandeur, une valeur relative de ces deux paramètres. Dans la plupart des travaux cités, la teneur en lignine a été exprimée en terme de « lignine Klason » et la composition a été déterminée par thioacidolyse. La technique de thioacidolyse permet de caractériser le type de lignine des Angiospermes en mesurant le pourcentage de liaisons intermoléculaires de type β -O-4 et le rapport S/G.

2.5.1 Modulation de l'expression de la PAL

Plusieurs séries de plantes transgéniques modulant l'expression de la PAL ont été obtenues. On pouvait s'attendre à ce que la modification de l'activité PAL catalysant la première étape du métabolisme des phénylpropanoïdes conduise à des perturbations assez profondes au cours du développement de la plante.

Des tabacs transgéniques inhibés pour l'activité PAL présentent une croissance ralentie, une altération de la forme et de la texture des feuilles, une altération de la morphologie des fleurs, des parois cellulaires plus fines et moins lignifiées au niveau du xylème secondaire ainsi que des lésions fluorescentes localisées (Elkind *et al.*, 1990; Korth *et al.*, 2001). Ces résultats mettent en évidence le rôle physiologique de la PAL et des produits dérivés dans le développement de la plante.

De plus, les tabacs transgéniques inhibés pour l'activité PAL présentent une susceptibilité accrue vis à vis de *Cercospora nicotianae* (champignon virulent) et ne développent plus de résistance systémique acquise (SAR) en réponse à une infection par le VMT. Ces effets sur les

mécanismes de résistance ont été corrélés à une diminution importante de l'accumulation de certains composés phénoliques dont l'acide chlorogénique et le SA (Maher *et al.*, 1994; Pallas *et al.*, 1996).

D'autres études ont montré que l'inhibition de la PAL permet non seulement de réduire la quantité de lignine, mais également de diminuer préférentiellement la synthèse d'unités G. La lignine de ces tabacs transgéniques est caractérisée par une modification de la composition chimique de la lignine puisque le rapport S/G augmente (Sewalt *et al.*, 1997a; Korth *et al.*, 2001). De plus, les parois sont moins résistantes à la dégradation enzymatique; ces plantes constituent donc un modèle d'étude intéressant en vue d'applications à des plantes fourragères (Sewalt *et al.*, 1997b).

Une légère augmentation de la quantité de lignine est observée dans la tige de plants de tabac surexprimant la PAL (Korth *et al.*, 2001). Par contre, un effet important est observé sur la synthèse de l'acide chlorogénique, puisque sa concentration est doublée dans les feuilles surexprimant la PAL par un facteur deux à trois, comparé aux plantes témoins (Howles *et al.*, 1996).

On constate que la modulation de l'expression de la PAL se répercute sur l'accumulation de nombreux composés dérivés de la voie des phénylpropanoïdes, dont l'acide chlorogénique le composé phénolique le plus abondant chez le tabac (Elkind *et al.*, 1990; Bate *et al.*, 1994; Maher *et al.*, 1994; Howles *et al.*, 1996; Korth *et al.*, 2001). L'interprétation des diverses modifications phénotypiques et physiologiques des plantes affectées dans l'expression de la PAL en est d'autant plus délicate et périlleuse.

2.5.2 Modulation de l'expression de la C4H

Trois séries indépendantes de tabacs transgéniques inhibés pour l'activité C4H ont été obtenues (Sewalt *et al.*, 1997a; Blount *et al.*, 2000; Blee *et al.*, 2001). Les plantes transgéniques ne présentent aucun phénotype anormal au cours du développement. La réduction de l'activité C4H conduit à une diminution de 30 à 60% de la quantité de lignine en fonction du niveau de répression de l'enzyme. La composition monomérique de la lignine est également modifiée. La quantité d'unité syringyles est fortement réduite et le rapport S/G est jusqu'à dix fois plus faible par rapport aux plantes témoins (Sewalt *et al.* 1997a; Blee *et al.*, 2001). Ces dernières observations sont en contradiction avec l'augmentation de S/G mesurée lorsque l'expression de la PAL est réprimée. En effet, ces deux enzymes, PAL et C4H, sont supposées intervenir de façon séquentielle dans la voie de biosynthèse de la lignine. Actuellement plusieurs explications sont avancées dont la notion de « channeling » qui sera discutée dans la dernière partie de ce manuscrit.

La surexpression de la C4H n'a aucun effet sur la quantité de lignine synthétisée, ni sur sa qualité (Sewalt *et al.* 1997a). Par contre, l'augmentation de l'activité C4H conduit à une

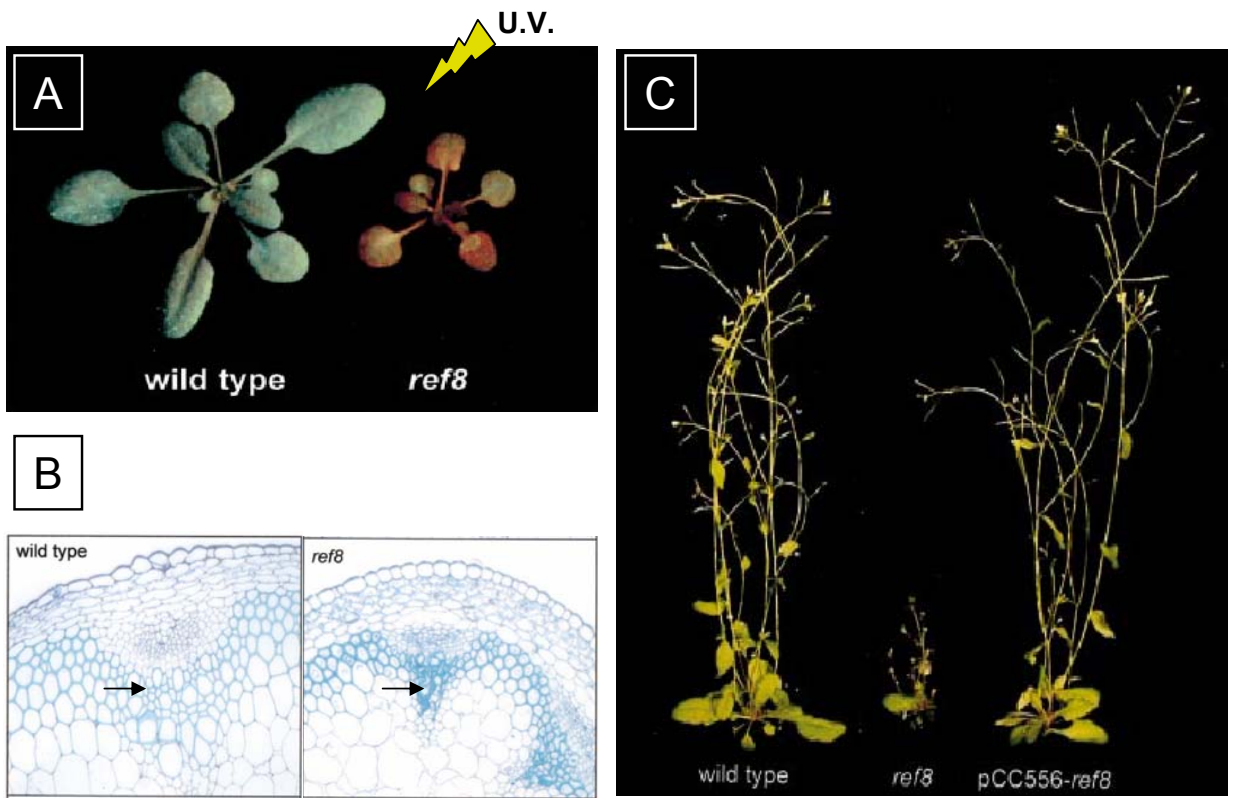


Figure 49. Phénotype du mutant *ref8* d'*Arabidopsis* (L. Heynh., écotype Columbia). (Franke *et al.*, 2002a, b).

A : observation d'une plantule sauvage (wild type) et *ref8* sous lumière U.V. La couleur bleu-vert des rosettes sauvages est due à la fluorescence du sinapoylmalate. La fluorescence rouge des plantes *ref8* est due à la fluorescence de la chlorophylle qui est révélée en l'absence de la fluorescence des esters sinapiques.

B : anatomie des tissus vasculaires de plantes sauvages et *ref8*. Les vaisseaux du xylème présentent une forme bien ronde chez les tissus sauvages, alors que ceux de la plante *ref8* sont beaucoup plus petits et malformés (flèches).

C : restauration du phénotype sauvage par complémentation du mutant *ref8* avec le gène codant pour la C3H. (Wild type : sauvage; *ref8* : mutant; *pCC556-ref8* : mutant *ref8* exprimant la C3H après transformation stable avec le gène *C3H*).

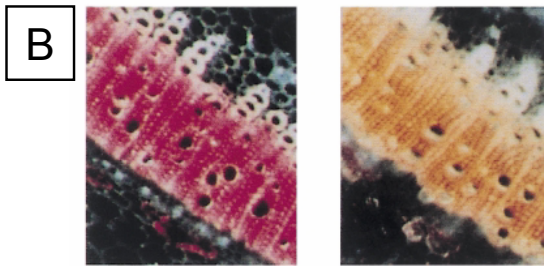
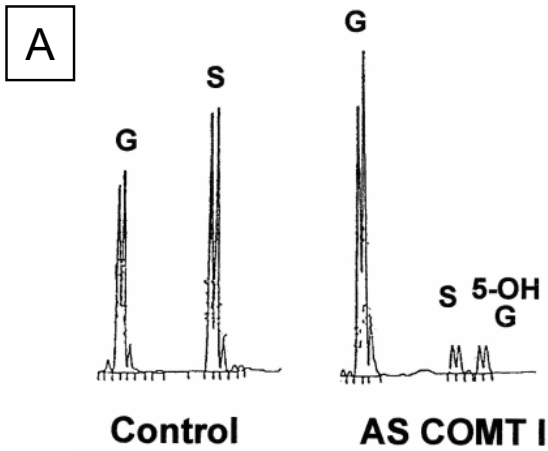


Figure 50. Analyse de la lignine de tabacs transgéniques réprimés pour l'expression de la COMT I.

L'inhibition de la COMT I conduit à une diminution de l'incorporation d'unités S. Cette modification de la composition se traduit par une coloration orangée des tissus du xylème avec le réactif de Mäule. (Atanassova *et al.*, 1995; Pinçon *et al.*, 2001a).

A : chromatogrammes montrant les principaux produits de dégradation libérés après thioacidolyse de la lignine de plantes contrôle ou antisens COMT I (AS COMT I). G, unité guaiacyle; S, unité syringyle; 5-OH G, unité 5-hydroxy guaiacyle.

B : coloration de coupes transversales de tige de plantes contrôle ou antisens COMT I avec le réactif de Mäule révélant spécifiquement les unités S.

élévation de la concentration en acide chlorogénique, ainsi qu'à une incorporation plus importante dans les parois cellulaires de dérivés d'acide *p*-cinnamique (Blount *et al.*, 2000).

2.5.3 Modulation de l'expression de la C3H : analyse du mutant *ref8* affecté dans l'expression du gène *C3H*

Le mutant *ref8* d'*Arabidopsis*, en plus de sa taille réduite, présente une modification de l'anatomie de ces tissus vasculaires avec notamment un effondrement des vaisseaux du xylème et une diminution de la résistance des parois cellulaires à la digestion par des hydrolases polysaccharidiques (**Fig. 49A et B**) (Franke *et al.*, 2002b). Une série d'analyses montre une réduction importante de la quantité de lignine (de l'ordre de 60 à 80%) et une modification spectaculaire de la composition de la lignine, puisque les unités monomériques incorporées correspondent presque uniquement à de nouvelles unités hydroxyphényl (H) (Franke *et al.*, 2002b). Les auteurs ont également observé une modification de la composition des métabolites secondaires solubles et estérifiés aux parois cellulaires. Le mutant accumule par exemple moins de sinapoylmalate, composé à l'origine de la fluorescence bleue sous U.V. des feuilles sauvages. Des expériences de complémentation avec le gène codant pour CYP98A3 ont permis de restaurer le phénotype sauvage (**Fig. 49C**) (Franke *et al.*, 2002a; Franke *et al.*, 2002b).

Ce travail confirme que le gène CYP98A3 code bien pour la C3H, enzyme responsable de l'étape d'hydroxylation en position 3 du noyau aromatique. De plus, cette découverte nous conduit à mieux prendre en considération le rôle des esters quinique et shikimique des acides *p*-coumarique et caféique, respectivement substrat et produit de la C3H, en tant qu'intermédiaires clefs dans la voie de biosynthèse de la lignine.

2.5.4 Modulation de l'expression de la COMT

La diminution de l'activité COMT a été obtenue, en produisant des plantes transgéniques exprimant le gène codant pour la COMT en orientation antisens ou sens, chez le tabac (Dwivedi *et al.*, 1994; Ni *et al.*, 1994; Atanassova *et al.*, 1995), chez le peuplier (Van Doorselaere *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1998; Jouanin *et al.*, 2000), chez la luzerne (Guo *et al.*, 2001) et chez le maïs (Piquemal *et al.*, 2002). Chez les quatre espèces, la composition de la lignine est fortement modifiée avec une réduction très importante du rapport S/G et l'incorporation d'un nouveau composé phénolique, le 5-hydroxygallaïacyl ou 5-OH G (**Fig. 50A et B**) (Atanassova *et al.*, 1995; Van Doorselaere *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 1998; Lapierre *et al.*, 1999; Jouanin *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001). La présence de 5-OH G avait déjà été précédemment décrite au sein de la lignine synthétisée par le mutant de maïs *bm3*, une plante naturellement déficiente pour l'activité COMT (Chabbert *et al.*, 1994).

L'analyse de la nature chimique des liaisons intermonomériques (par thioacidolyse et RMN) démontre que le 5-OH G est incorporé dans la lignine en tant que monolignol (Jouanin *et al.*, 2000; Ralph *et al.*, 2001a, 2001b). Dans les plantes réprimées pour l'activité COMT, le rendement de la thioacidolyse est plus faible que dans les plantes sauvages, indiquant une diminution significative des cibles de la dégradation, à savoir les liaisons β -O-4. En effet, un enrichissement en liaisons de type carbone-carbone a été détecté en accord avec la diminution de l'incorporation d'unités diméthoxylées (Lapierre *et al.*, 1999; Jouanin *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001). L'augmentation de la fréquence de ces structures dimériques correspond à une élévation du degré de condensation de la lignine; la lignine de ces Angiospermes (tabac, peuplier, luzerne, maïs) se rapproche de la lignine de Gymnospermes.

Passons à l'impact de la répression de l'activité COMT sur la quantité de la lignine. Le mutant *bm3* de maïs, affecté dans l'activité COMT (Kuc *et al.*, 1968; Vignols *et al.*, 1995), possède moins de lignine. Ces résultats ont été confirmés par une approche de transgénèse (Piquemal *et al.*, 2002). Mais cette tendance n'a pas été confirmée par l'ensemble des plantes transgéniques obtenues. En effet, en fonction des espèces végétales ciblées par la transgénèse, du niveau de répression de l'activité COMT et peut-être des techniques d'analyses employées, la quantité de lignine synthétisée est dans certains cas inchangée (Guo *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 1998; Van Doorsselaere *et al.*, 1995; Dwivedi *et al.*, 1994; Atanassova *et al.*, 1995) et dans les autres diminuée (Guo *et al.*, 2001; Jouanin *et al.*, 2000; Ni *et al.*, 1994). Ces données mettent peut-être également en lumière la nécessité d'harmoniser les conditions de culture des plantes, l'âge des plantes analysées et de mieux maîtriser les conditions environnementales en général.

Ces résultats démontrent néanmoins que la COMT est essentielle à la synthèse des unités S de la lignine et ceci pour les différentes espèces végétales étudiées. Ces données vont dans le même sens que celles obtenues par Li et Coll. (2000), qui montrent *in vitro*, pour plusieurs espèces végétales, que le 5-hydroxyconiferaldehyde est le substrat préféré de la COMT.

Chez la luzerne, une réduction de l'activité COMT affecte à la fois la quantité d'unités G et S (Guo *et al.*, 2001), en accord avec les résultats obtenus *in vitro* par Parvathi et Coll. (2001). A cette exception près, les résultats suggèrent que la COMT est responsable de la seconde étape de méthylation, et qu'une seconde *O*-méthyltransférase, la CCoAOMT, serait impliquée de manière spécifique dans la première étape de méthylation conduisant à l'unité G.

2.5.5 Modulation de l'expression de la CCoAOMT

La diminution de l'expression de la CCoAOMT affecte le contenu en lignine (lignine Klason) en faisant chuter sa quantité de 12 à 50% dans des tabacs transgéniques (Zhong *et al.*, 1998, 2000; Pinçon *et al.*, 2001a), la luzerne (Guo *et al.*, 2001; Marita *et al.*, 2003) et le peuplier (Meyermans *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000). Chez le tabac et le peuplier, la diminution de la quantité de lignine est due à la réduction de l'incorporation des unités G et S

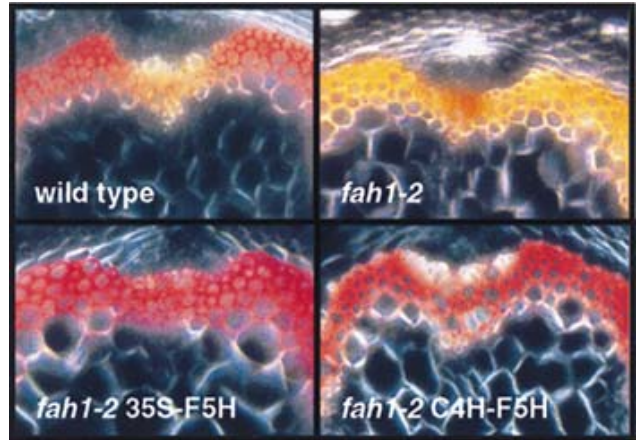
A**B**

Figure 51. Phénotype du mutant *fah 1-2* affecté dans l'expression de la F5H.

Le mutant *fah 1-2* présente une modification de la composition de la lignine au niveau des tissus conducteurs. De plus, une disparition de la fluorescence verte des feuilles est observée sous lumière U.V. en raison de l'absence de l'accumulation des esters sinapiques. Le phénotype sauvage est restauré en exprimant le gène F5H sous le contrôle du promoteur 35S ou celui de la C4H.

A : Observation de feuilles de lignées sauvages, *fah 1-2*, ou transgéniques sous lumière U.V. Les lignées transgéniques expriment le gène F5H soit sous le contrôle du promoteur 35S soit sous le contrôle du promoteur de la C4H. Le mutant *fah 1-2* accumule beaucoup moins de sinapoylmalate dans ses feuilles, rendant celles-ci rouges sous lumière U.V. (Ruegger *et al.*, 1999).

B : Etude histochimique de coupes transversales d'hampe floral d'*Arabidopsis*; coloration de Mäule réagissant spécifiquement avec les unités S. Le mutant *fah 1-2* présente une coloration orangée en raison de la faible teneur en unités S de la lignine synthétisée. L'expression du gène sauvage dans la plante complète la mutation (voir texte) (Meyer *et al.*, 1998).

(Zhong *et al.*, 1998, 2000; Meyermans *et al.*, 2000). En raison d'un effet plus prononcé sur les unités G, le rapport S/G augmente (Zhong *et al.*, 1998; Meyermans *et al.*, 2000). Par contre, la quantité d'unités S n'est pas affectée dans des luzernes transgéniques (Guo *et al.*, 2001) ni dans d'autres tabacs transgéniques (Pinçon *et al.*, 2001a).

Contrairement aux peupliers transgéniques, qui ne sont pas affectés dans leur développement (Zhong *et al.*, 2000), la répression de l'expression de la CCoAOMT chez le tabac a pour effet de ralentir la croissance des plantes et d'altérer le développement des feuilles et des fleurs (Pinçon *et al.*, 2001a). Chez le peuplier, l'inhibition de l'expression de la CCoAOMT a également pour conséquence d'augmenter la fluorescence des parois cellulaires des vaisseaux du xylème. Ce phénotype pourrait s'expliquer par l'accumulation d'acide *p*-hydroxybenzoïque estérifié à la paroi (Meyermans *et al.*, 2000). De plus, un certain nombre de dérivés glucosylés d'acides caféique, sinapique ou vanilique s'accumulent dans la tige (Meyermans *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001). L'accumulation de ces glucosides pourrait correspondre à une forme de détoxification des substrats de la CCoAOMT et de leurs dérivés (Meyermans *et al.*, 2000).

La répression simultanée de la COMT et de la CCoAOMT chez le tabac (Zhong *et al.*, 1998; Pinçon *et al.*, 2001a) et la luzerne (Guo *et al.*, 2001) conduit à l'obtention d'effets combinatoires et/ou additifs. En comparaison avec les transformants simples correspondants, une réduction plus importante de la quantité de lignine a été mesurée chez le tabac (Pinçon *et al.*, 2001a) mais pas chez la luzerne (Guo *et al.*, 2001). Chez les deux espèces végétales, le rapport S/G est réduit.

2.5.6 Modulation de l'expression de la F5H par transgénèse et analyse du mutant *fah 1-2* affecté dans l'expression du gène *F5H*

Le mutant *fah 1-2* synthétise une lignine déficiente en unités syringyles (Chapple *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1998), avec parallèlement une augmentation de la fréquence des liaisons inter-monomériques de type carbone-carbone (Marita *et al.* 1999). De plus, ce mutant est affecté dans la synthèse du sinapoylmalate (**Fig. 51A**). Lorsque le gène *F5H* d'*Arabidopsis* est exprimé sous le contrôle du promoteur 35S chez le mutant *fah 1-2*, on observe un phénomène de complémentation qui permet de retrouver une qualité de lignine comparable à celle du sauvage (**Fig. 51B**) (Meyer *et al.*, 1998; Marita *et al.*, 1999). Par contre, lorsque le même type d'expérience est réalisé en utilisant un promoteur dont l'expression est associée à la lignification, celui du gène *C4H*, la lignine déposée est presque entièrement composée d'unités syringyles reliées par des liaisons de type β -O-4 (Meyer *et al.*, 1998; Marita *et al.*, 1999). De façon similaire, les tabacs et les peupliers transgéniques transformés avec la même construction chimérique ont également une lignine enrichie en unités syringyles (Franke *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que la F5H est une étape limitante dans la formation de l'unité S de la

lignine d'*Arabidopsis* et peut donc jouer un rôle crucial dans la composition et la qualité de la lignine synthétisée.

2.5.7 Modulation de l'expression de la 4CL

Des plantes transgéniques présentant une réduction de l'activité 4CL ont été produites chez le tabac (Kajita *et al.*, 1996, 1997), *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 1997b) et le peuplier (Hu *et al.*, 1999). Chez le tabac, l'inhibition de l'expression de la 4CL a atteint 90% pour conduire à une réduction de 25% de la quantité de lignine. Chez le peuplier et *Arabidopsis*, le contenu de la lignine a chuté de 45-50%, correspondant à une diminution de l'activité 4CL supérieure à 90%.

L'impact de l'inhibition de l'expression de la 4CL sur la composition de la lignine n'est pas clair. Dans certains cas, elle n'a aucun effet sur le rapport S/G (Hu *et al.*, 1999), dans d'autres, on observe une diminution de l'incorporation des dérivés diméthoxylés (S) (Kajita *et al.*, 1997) et enfin chez *Arabidopsis* seuls les dérivés monométhoxylés (G) semblent affectés avec une diminution de 40% (Lee *et al.*, 1997). Chez les tabacs et les peupliers transgéniques, on a noté une augmentation de la quantité de composés phénoliques estérifiés aux parois et plus particulièrement des acides *p*-coumarique, caféique et sinapique, substrats de la 4CL.

De façon surprenante, la réduction de l'activité 4CL a également des effets très variés sur le développement des plantes. Par exemple, les tabacs transgéniques présentent des parois cellulaires collapsées au niveau du xylème et une croissance réduite, alors que les peupliers présentent une morphologie cellulaire normale (Kajita *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1999). Ces derniers présentent même une croissance accélérée par rapport aux plantes témoins.

L'interprétation de ces données hétérogènes reste délicate et on peut avancer les mêmes explications que celles présentées pour la COMT. De plus, l'existence de plusieurs isoenzymes au sein d'une même espèce, présentant des spécificités de substrats différentes ainsi que des régulations spatio-temporelles spécifiques, pourrait expliquer l'hétérogénéité des résultats obtenus en fonction des espèces végétales, ainsi que l'apparition d'effets secondaires inattendus.

2.5.8 Modulation de l'expression de la CCR par transgénèse et analyse du mutant *irx4* affecté dans l'expression du gène *CCR*

En analysant des tabacs transgéniques réprimés pour l'expression de la CCR (Piquemal *et al.*, 1998; Ralph *et al.*, 1998; O'Connel *et al.*, 2002), les auteurs ont observé une réduction d'environ 50% du contenu en lignine, une augmentation du rapport S/G (principalement due à une diminution de la proportion des unités G) et une augmentation de composés phénoliques estérifiés aux parois (acides férulique et sinapique). Une augmentation de la concentration de

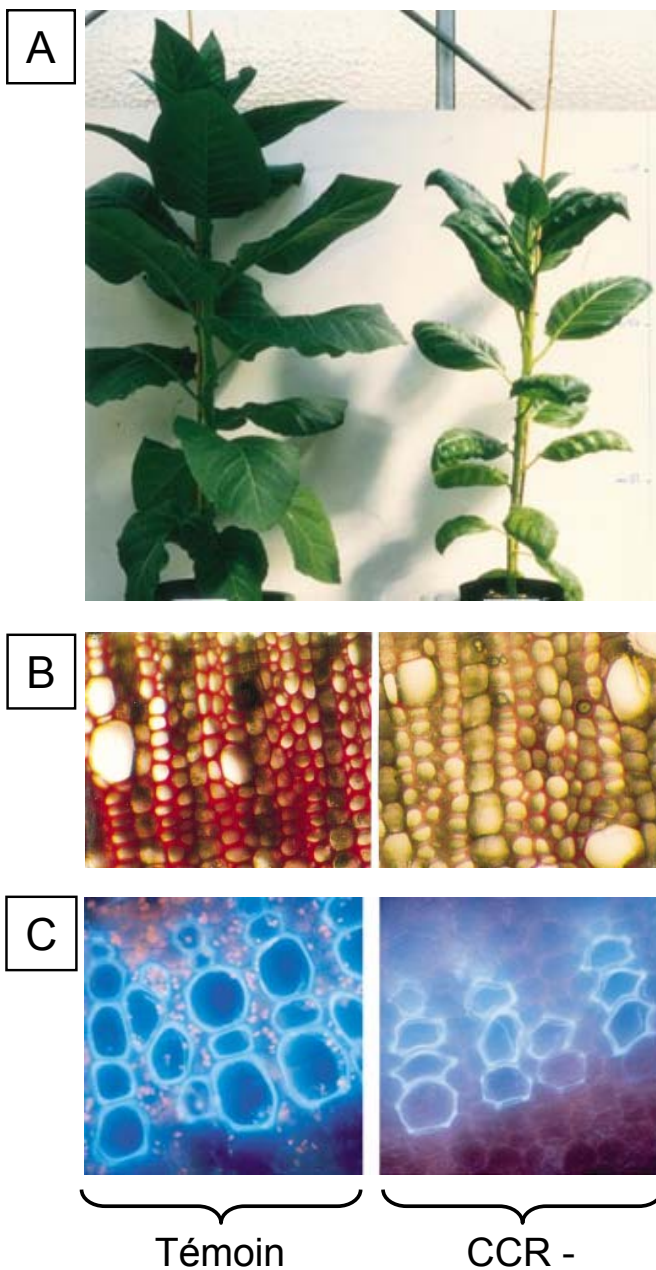


Figure 52. Phénotype de plants de tabacs réprimés pour l'expression de la CCR (plantes CCR -). (Piquemal *et al.*, 1998).

A : les plantes CCR - présentent un retard de croissance par rapport aux plantes témoins.

B : la coloration de coupes transversales de tige avec le réactif de Mäule révèle également une diminution de l'incorporation des unités S dans la lignine des plantes CCR -. La coloration rouge des tissus du xylème est très faible chez ces plantes.

C : sous lumière U.V., l'autofluorescence de la lignine des tissus du xylème des plantes CCR - est plus faible et la morphologie des vaisseaux est fortement perturbée.

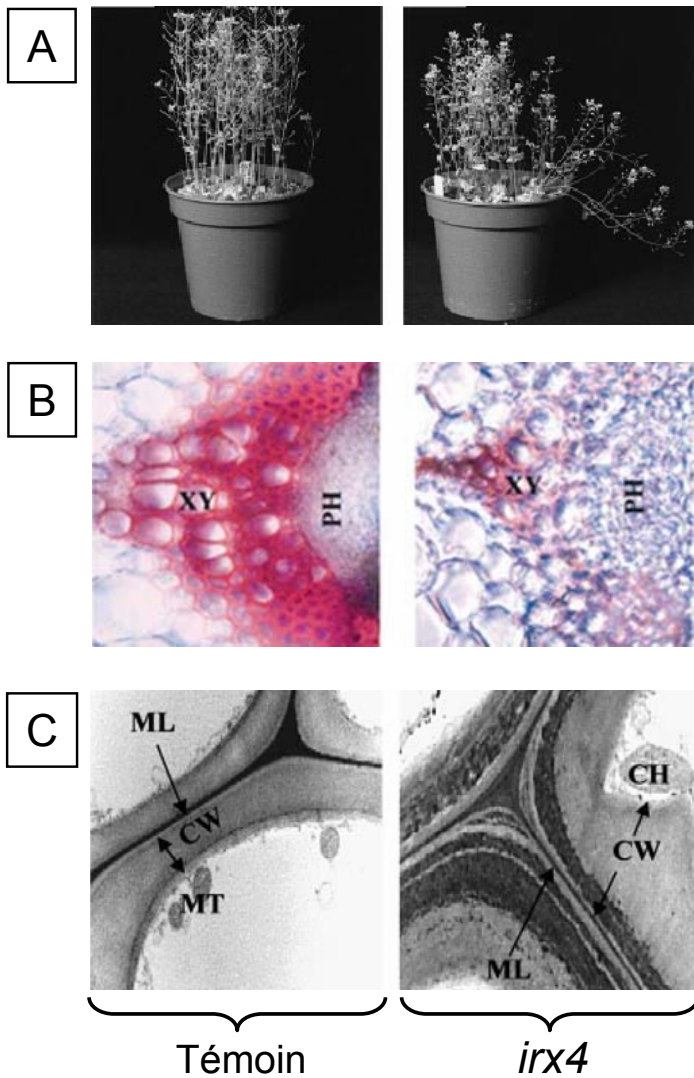


Figure 53. Phénotype du mutant *irx4* d'*Arabidopsis* affecté dans l'expression de la CCR. (Jones *et al.*, 2001).

A : le soutien mécanique des plantes *irx4* semble être affecté et leur croissance ralentie par rapport aux plantes sauvages.

B : la coloration de coupes transversales de tige avec le phloroglucinol met en évidence une diminution importante de la teneur en lignine au niveau des vaisseaux du xylème des plantes *irx4*. La coloration rouge des tissus du xylème est très réduite chez ces plantes par rapport aux tissus sauvages. XY, xylème ; PH, phloème.

C : morphologie des parois cellulaires sauvages et *irx4*. Photos prises au microscope électronique démontrant l'altération de l'ultrastructure des parois. ML, lamelle moyenne; CW, paroi cellulaire; MT, mitochondrie; CH, chloroplastes.

certaines composés phénoliques solubles est également observée au niveau des feuilles, notamment pour l'acide chlorogénique (Chabannes *et al.*, 2001a). Les individus possédant l'activité CCR la plus faible présentent des phénotypes particuliers tels que des vaisseaux conducteurs collapsés, une croissance ralentie et un développement foliaire anormal (**Fig. 52A, B et C**). Une altération importante des parois cellulaires est observée, avec notamment une perte de l'arrangement des microfibrilles de cellulose, conduisant à une réduction de la cohésion pariétale (Pinçon *et al.*, 2001b). Chabannes et Coll. (2001a) ont montré que la réduction du dépôt de lignine touchait principalement les couches pariétales S2 et S3. Une diminution des rendements de thioacidolyse a été démontrée chez les plantes transgéniques, indiquant que la lignine synthétisée était plus condensée (Piquemal *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 2002).

Un mutant appelé *irx4* pour « irregular xylem », affecté dans l'expression de la CCR, a été identifié chez *Arabidopsis* (Jones *et al.*, 2001). Ces plantes sont également caractérisées par une réduction du contenu en lignine (50%), des vaisseaux collapsés, une altération de la structure des parois, ainsi qu'une croissance et une morphologie altérées (**Fig. 53**).

L'ensemble de ces données indique que la CCR contrôle étroitement la quantité de lignine synthétisée, mais la répression de son expression conduit à des effets indésirables qui peuvent limiter les applications par génie génétique.

Le croisement de tabacs réprimés pour la COMT avec des tabacs réprimés pour la CCR a permis de réduire simultanément l'expression des deux enzymes (Pinçon *et al.*, 2001b). Les lignées présentant les taux d'inhibition les plus forts pour les deux gènes, possèdent une lignine dont les caractéristiques sont similaires à celles des parents réprimés pour la CCR seule. Ces observations peuvent provenir de la position de la CCR en amont de la COMT; la répression de la CCR ne permettrait pas la production chez les doubles transformants, des dérivés 5-hydroxy gaïacyles, caractéristiques des parents réprimés pour la COMT.

2.5.9 Modulation de l'expression de la CAD par transgénèse et analyse de mutants naturels

Des plantes transgéniques présentant une réduction de l'activité CAD ont été produites chez le tabac (Halpin *et al.*, 1994; Hibino *et al.*, 1995; Stewart *et al.*, 1997; Yahiaoui *et al.*, 1998), le peuplier (Baucher *et al.*, 1996) et la luzerne (Baucher *et al.*, 1999). Deux mutants naturels *cad* ont été caractérisés : un chez le pin (MacKay *et al.*, 1997) et l'autre chez le maïs (Halpin *et al.*, 1998). Le mutant de pin incorpore dans la lignine dix fois plus d'alcool dihydroconiférylique que la plante sauvage (Ralph *et al.*, 1997, 1999b, 2001a). A l'inverse, ce nouveau monolignol n'a pas été trouvé dans la lignine des Angiospermes réprimés dans l'expression de la CAD (Ralph *et al.*, 1998). Par ailleurs, une quantité accrue de dérivés cinnamaldéhydes a été détectée dans la lignine des tabacs transgéniques (Halpin *et al.*, 1994;

Ralph *et al.*, 1999a, 2001a) et du mutant de pin (Ralph *et al.*, 1997). Une analyse par RMN de la lignine des tabacs réprimés pour la CAD a permis de montrer que les composés sinapaldéhydes peuvent réaliser des liaisons β -O-4 avec les unités G et S, alors que le coniferaldéhyde se lie uniquement avec les unités S de la lignine (Kim *et al.*, 2000). Lorsque des moutons sont nourris avec ces tabacs ou cette luzerne transgéniques, il a été démontré *in situ* une meilleure dégradabilité des parois cellulaires, indiquant que la CAD peut être une cible intéressante en vue d'augmenter la digestibilité des fourrages (Bernard-Vailhé *et al.*, 1995; Baucher *et al.*, 1999).

Une légère diminution du contenu en lignine a été mesurée dans le bois des peupliers transgéniques (Lapierre *et al.*, 1999; Pilate *et al.*, 2002) et dans le mutant *cad* de pin (MacKay *et al.*, 1997). Ces mêmes peupliers ne présentent aucune modification dans la composition en unités S et G, ni dans le pourcentage des liaisons β -O-4, mais une augmentation de la teneur en groupes phénoliques libres dans la lignine (Lapierre *et al.*, 1999). A l'opposé, le rapport S/G de la lignine des tabacs (Ralph *et al.*, 1998) et des peupliers transgéniques (Baucher *et al.*, 1999) est réduit, suggérant que les structures moins condensées (S) sont les plus touchées. Ces données vont à l'encontre du modèle proposé par Li et Coll. (2001), selon lequel la SAD (et pas la CAD) est impliquée spécifiquement dans la biosynthèse des unités S chez les angiospermes.

Une répression simultanée de l'activité CAD et CCR a été obtenue par croisement entre des plantes transgéniques homozygotes réprimées pour la CAD (Halpin *et al.*, 1994) et la CCR (Piquemal *et al.*, 1998; Chabannes *et al.*, 2001b). La quantité et la composition de la lignine sont touchées de manière comparable à ce qui avait été observé pour les parents réprimés pour la CCR. Le phénotype des doubles transformants est normal avec une légère altération de la forme des vaisseaux, montrant que les plantes peuvent tolérer des réductions importantes de leur contenu en lignine (Hu *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 1998).

Une répression simultanée de la COMT, de la CCR et de la CAD a été obtenue chez le tabac grâce à une seule construction chimérique. Les plantes présentent une croissance ralentie et la lignine synthétisée possède les caractéristiques de la lignine déposée par les plantes réprimées pour chacune de ces trois enzymes; par exemple, la lignine présente une coloration rouge (caractéristique de la répression de la CAD), contient des vaisseaux collapsés (caractéristique de la répression de la CCR) et la quantité d'unités S est réduite (caractéristique de la répression de la COMT) (Abott *et al.*, 2002). Cette approche pour réprimer simultanément l'expression de plusieurs gènes s'est avérée plus efficace que la technique de croisement entre plusieurs plantes transgéniques affectées dans différents gènes.

2.5.10 Modulation de l'expression des peroxydases

Bien que les peroxydases soient considérées comme étant les enzymes responsables, avec les laccases, de la condensation finale des alcools cinnamyls, aucune preuve

définitive n'a encore été apportée. Le nombre important de gènes codant pour des peroxydases (Tognolli *et al.*, 2002) et la faible spécificité de ces enzymes constituent des obstacles majeurs dans la détermination des isoenzymes impliquées spécifiquement dans la lignification.

Ainsi, même si l'implication de peroxydases dans la polymérisation oxydative des monolignols est probable sur la base de données biochimiques, aucun changement évident de la quantité de lignine n'a été observé dans des tabacs transgéniques réprimés dans l'expression d'une peroxydase anionique majeure (Lagrimini *et al.*, 1997).

La surexpression de gènes codant pour des peroxydases dans des peupliers (Christensen *et al.*, 2001) et des tabacs (Elfstrand *et al.*, 2002) transgéniques a conduit, respectivement, à une augmentation de 800 et 5 fois de l'activité peroxydase totale. La modification génétique n'a eu aucun effet sur le contenu en lignine ou la composition en unités G et S. Néanmoins, il a été noté une diminution de la flexibilité des tiges de tabacs transgéniques, suggérant une modification des propriétés de la paroi. De plus, ces tabacs surexprimant la peroxydase présentent une susceptibilité accrue à *Phytophthora parasitica*, mais résistent mieux à la multiplication d'*Erwinia carotovora*. A l'opposé, une lignée de tabac transgénique indépendante surexprimant fortement la peroxydase présente une augmentation du contenu en lignine dans les feuilles, la tige et les racines (Lagrimini, 1991; Chabbert *et al.*, 1992). Mais aucun changement dans la composition de la lignine n'a été observé (Chabbert *et al.*, 1992). La surproduction d'une peroxydase anionique chez la tomate conduit également à une augmentation du contenu en lignine dans les feuilles et les fruits (Lagrimini *et al.*, 1993; El Mansouri *et al.*, 1999).

2.5.11 Modulation de l'expression des laccases

Des peupliers transgéniques réprimés dans l'expression d'une laccase ne présentent pas de modification de leur croissance ni de leur quantité en lignine (Ranocha *et al.*, 2002). Par contre, ces plantes présentent des parois cellulaires irrégulières au niveau du xylème et accumulent deux à trois fois plus de composés phénoliques solubles. Ces composés s'accumulent préférentiellement dans le parenchyme des vaisseaux du xylème. Cette observation pourrait suggérer une absence ou une mauvaise polymérisation au niveau de la paroi (Ranocha *et al.*, 2002).

2.5.12 Modulation de l'expression d'autres gènes affectant la biosynthèse de la lignine

Un certain nombre d'études affectant l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription ou l'expression de gènes impliqués dans des voies métaboliques en amont de

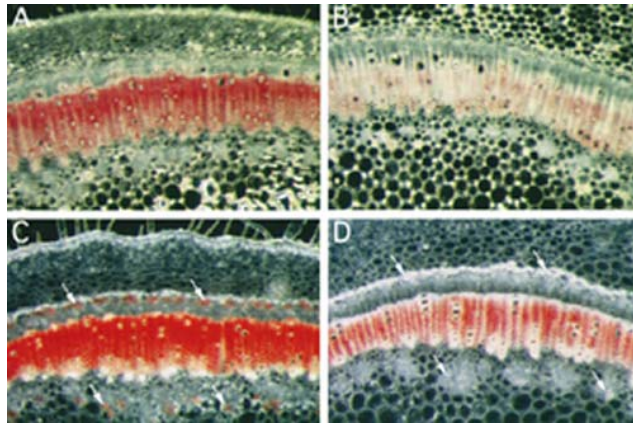
A

Témoin

Plante surexprimant
AmMYB308**B**

Phloroglucinol

Mäule



Témoin

Surexpression
AmMYB308

Figure 54. Phénotype des tabacs surexprimant le facteur de transcription *AmMYB308*, de type MYB R2R3.

(Tamagnone *et al.*, 1998a).

A : les plantes surexprimant ce facteur de transcription d'*Antirrhinum* présentent un retard de croissance par rapport aux plantes témoins.

B : coloration histochimique de coupes transversales de tige de plantes témoins et transgéniques. La surexpression du facteur de transcription MYB *AmMYB308* affecte la quantité (Phloroglucinol) et la composition (Mäule) de la lignine synthétisée.

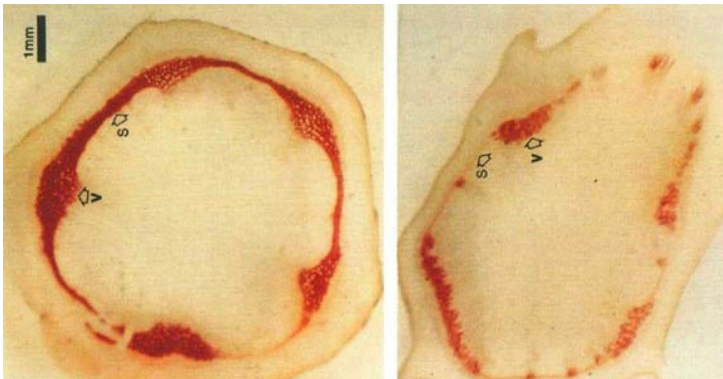
A



Témoin

DAHPS -

B



Témoin

DAHPS -

Figure 55. Phénotype de plants de pomme de terre réprimés dans l'expression de la 3-déoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHPS) : DAHPS-. (Jones *et al.*, 1995).

A : les plantes DAHPS - présentent une croissance fortement ralentie par rapport aux plants de pomme de terre témoins.

B : coloration histochimique de coupes transversales de tige avec le phloroglucinol. Les plantes DAHPS - sont moins lignifiées (coloration rouge moins intense au niveau des tissus conducteurs). S, sclérenchyme; V, vaisseaux vasculaires.

celle des phénylpropanoïdes (voie du shikimate) ont également conduit à une perturbation de la synthèse de la lignine.

Par exemple, des tabacs transgéniques surexprimant des facteurs de transcription MYB ont été obtenus (Tamagnone *et al.*, 1998a, b). La surexpression de ces facteurs de transcription MYB d'*Antirrhinum* réprime l'expression de plusieurs gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes dont la C4H, la 4CL et la CAD, affectant la croissance des plantes et modifiant la biosynthèse de la lignine (**Fig. 54A et B**) (Tamagnone *et al.*, 1998b).

Plus récemment, Borevitz et Coll. (2000) ont identifié un nouveau facteur de transcription de type R2R3-MYB régulant le métabolisme des phénylpropanoïdes, grâce à une approche d'« activation tagging ». L'insertion au hasard d'un promoteur fort dans le génome d'*Arabidopsis* a permis la surexpression d'un facteur, résultant en une activation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Cette activation se traduit par une induction de l'expression des gènes codant pour les protéines PAL, CHS et DFR, par une augmentation de l'accumulation d'esters d'HCAs et de flavonoïdes dont des anthocyanines et une élévation de la teneur en lignine. Ces plantes présentent également un ralentissement de leur croissance.

Le contrôle transcriptionnel de la biosynthèse de la lignine par des protéines appartenant à une autre classe de facteurs de transcription, les facteurs LIM, a été démontré (voir paragraphe 1.6.2). En effet, des tabacs transgéniques réprimés dans l'expression d'un gène codant pour un facteur LIM ont été obtenus. Ces plantes présentent une répression des gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes tels que la *PAL*, la *4CL* et la *CAD* ainsi qu'une réduction de 20% du contenu en lignine (Kawaoka *et al.*, 2000; Kawaoka et Ebinuma, 2001).

Des pommes de terre transgéniques réprimées dans l'expression de la DAHP synthase, une enzyme de la voie du shikimate (voir paragraphe 3.2.1.1) sont également affectées dans la biosynthèse de la lignine. Les plantes présentent une taille réduite avec notamment une diminution importante de la croissance de la tige (**Fig. 55A**). Des analyses histochimiques sur des coupes transversales de tige révèlent une réduction importante de la lignification des tissus conducteurs (**Fig. 55B**) (Jones *et al.*, 1995).

2.5.13 Conclusions

Pour une même enzyme, les différentes expériences de modulation d'expression ont conduit à des résultats souvent hétérogènes, voire contradictoires. Les sources de variabilité sont nombreuses :

- la diversité des espèces végétales étudiées (Gymnospermes, Angiospermes, Monocotylédones, Dicotylédones),
- l'existence pour certaines enzymes de plusieurs isoformes,
- les effets aléatoires de l'expression du transgène liés à son insertion au hasard dans le génome,

- l'existence des phénomènes de PTGS (Post Transcriptionnal Gene Silencing),
- les niveaux variables de l'inhibition des activités enzymatiques d'une lignée à une autre,
- les moyens utilisés pour mesurer ces niveaux d'expression,
- les conditions de culture et les techniques chimiques employées pour déterminer la teneur et la composition de la lignine.

Toutes ces données obtenues par génie génétique sont synthétisées dans deux revues (Baucher, 1998; Anterola et Lewis, 2002). L'ensemble des résultats démontrent tout d'abord qu'il est possible de modifier la lignine de façon qualitative et/ou quantitative en touchant une seule étape du métabolisme des phénylpropanoïdes. L'obtention de transformants multiples, affectés simultanément dans l'expression de plusieurs enzymes de la voie, peut également avoir un certain intérêt pour cumuler les effets.

Dans la voie des phénylpropanoïdes, les effets de la réduction des activités PAL, C4H, 4CL, et CCoAOMT démontrent que ces enzymes semblent contrôler la quantité de lignine formée. Cependant, l'inhibition d'enzymes trop en amont de la voie de biosynthèse de la lignine, comme la PAL, la C4H ou la C3H, peut affecter d'autres métabolites puisque ces enzymes conduisent également à la biosynthèse du CGA, du SA, des flavonoïdes, des isoflavonoïdes et des stilbènes (**Fig. 3 et 5**). Il semble donc plus judicieux de cibler des étapes plus en aval pour atteindre spécifiquement la lignine.

D'autres données montrent que la plante s'adapte très bien à une modification de la composition de la lignine, comme l'attestent les plantes transgéniques ayant incorporé des unités non conventionnelles. Cette plasticité de la lignine démontre la capacité des enzymes de polymérisation à incorporer des unités inhabituelles.

Les tentatives de modification de la lignine montrent que certaines cibles ont un intérêt particulier pour l'industrie papetière. Ainsi, les plantes transgéniques inhibées pour la CAD ou la CCR, ou surexprimant la F5H synthétisent des lignines plus aptes à la délignification papetière. On peut même imaginer que l'expression d'enzymes d'Angiosperme chez des Gymnospermes permettrait la synthèse d'unités S et donc d'aboutir à une lignine moins condensée et moins résistante à la dégradation lors de la préparation de la pâte à papier.

L'impact prévisible sur l'industrie fourragère n'est pas négligeable lui non plus, puisque les plantes inhibées pour la PAL, la C3H, la COMT ou encore la CAD semblent moins résistantes à la dégradation enzymatique, par des cellulases par exemple.

On peut remarquer que les taux d'inhibition des activités enzymatiques doivent souvent être élevés pour que des effets nets soient observés. De plus, la surexpression d'enzymes du métabolisme telles que la PAL, la 4CL, la COMT, la CAD n'a pas eu d'effet sur la lignine. Ces résultats mettent en lumière que la majorité des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ne constituent pas des étapes limitantes. Par contre, les études de surexpression de la F5H (Meyer *et al.*, 1998), qui ont conduit au dépôt d'une lignine pratiquement exclusivement constituée d'unités S, ont démontré que cette étape était limitante.

L'étape catalysée par la F5H pourrait donc jouer un rôle régulateur important, notamment dans la détermination du rapport S/G de la lignine synthétisée au cours du développement de la plante.

2.6 Notre connaissance de la voie de biosynthèse de la lignine : synthèse des dernières avancées

Bien que la voie conduisant à la lignine ait fait l'objet de nombreuses études ces vingt dernières années, de nouvelles données nécessitent une réévaluation de ce qu'on croyait acquis. Il est important de souligner que l'étude des transformants, présentés précédemment, a apporté des renseignements très précieux et parfois inattendus concernant la voie de biosynthèse elle-même. Il est apparu que le métabolisme des phénylpropanoïdes n'est pas aussi linéaire qu'on le pensait. L'étude, *in vitro*, des activités enzymatiques ne permet pas toujours de connaître la fonction des enzymes *in vivo*. Ainsi, la possibilité d'inhiber spécifiquement une étape de la biosynthèse et d'observer les effets sur les flux métaboliques a remis en question certains schémas biosynthétiques qu'on croyait bien établis (Humphreys et Chapple, 2002).

1- Les premiers modèles de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes décrivaient l'ensemble des étapes d'hydroxylation et de méthylation au niveau des acides hydroxycinnamiques. Puis, via les esters de CoA correspondants, c'est-à-dire les intermédiaires activés, les acides férulique et sinapique étaient réduits respectivement en unités G et S.

2- Vers les années 1990-95, la découverte d'une nouvelle OMT, la CCoAOMT, spécifique des esters de CoA a amené à prendre en considération une voie alternative conduisant aux unités G. De plus, la répression de la COMT dans des plantes transgéniques a conduit à l'inhibition de la synthèse des unités S et l'incorporation de 5-OH G dans la lignine, ce qui suggèrerait que la COMT catalyse, *in vivo*, uniquement la deuxième étape de méthylation (Atanassova *et al.*, 1995; Van Doorselaere *et al.*, 1995). L'inhibition de la CCoAOMT dans des tabacs transgéniques conduit à une réduction de la quantité totale de lignine, et à une diminution de l'incorporation soit des unités G seules, soit des unités G et S (Zhong *et al.*, 1998; Pinçon *et al.*, 2001a). La CCoAOMT catalyse donc la première étape de méthylation, et ceci non pas au niveau des acides, mais des esters de CoA. La structure chimique du CoA ainsi que le rôle des esters de CoA dans le métabolisme des phénylpropanoïdes sont présentés en détail paragraphe 2.7.

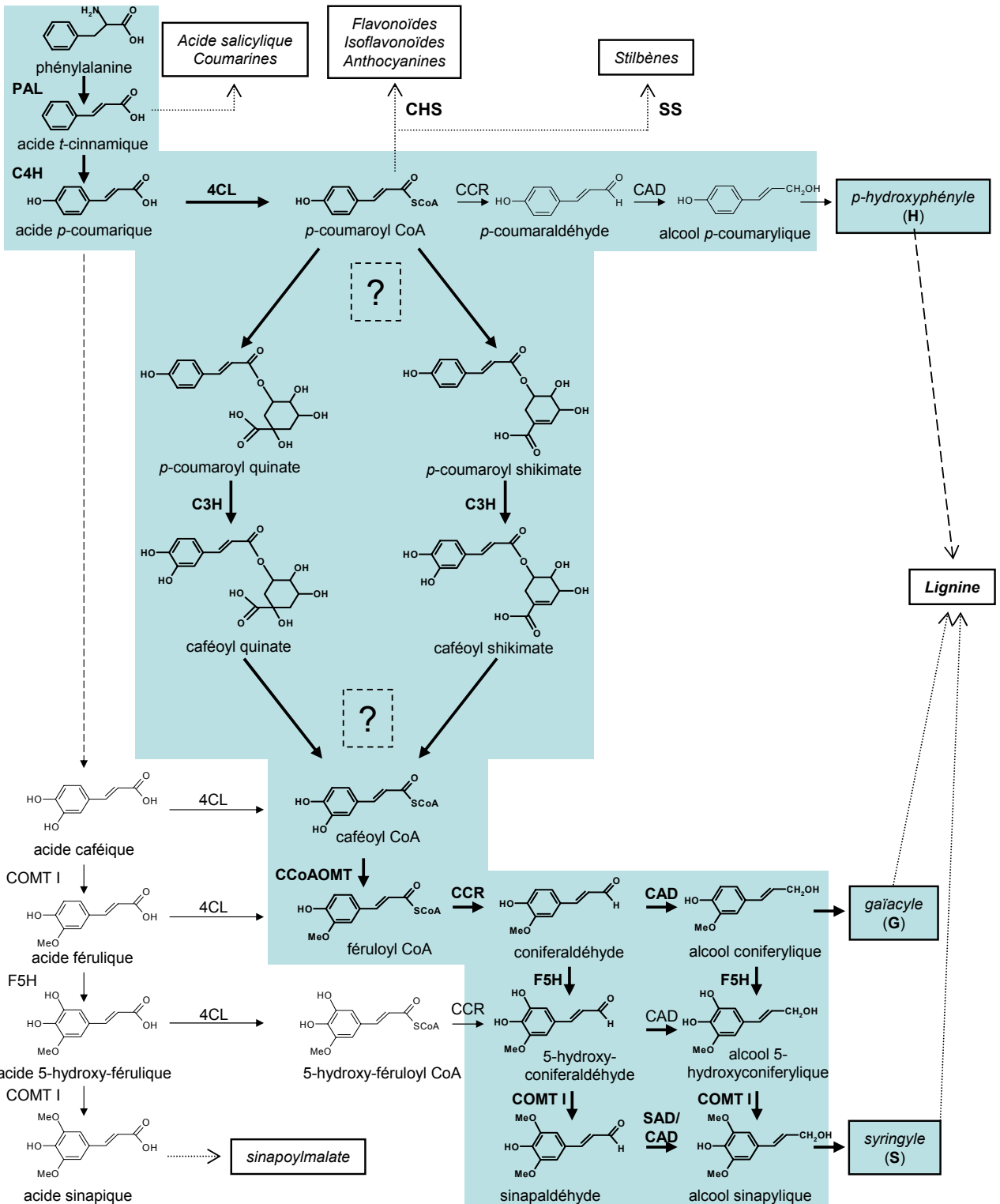


Figure 56. Métabolisme des phénylpropanoïdes et voie de biosynthèse de la lignine actualisés chez les Angiospermes. La zone bleue indique la voie métabolique la plus probable permettant de conduire aux unités monomériques de la lignine à partir de la Phe. Les abréviations de chaque enzyme sont indiquées Fig. 19 et 34. Le point d'interrogation (?) représente l'acyltransférase que nous avons caractérisée chez le tabac et qui fera l'objet du premier chapitre de ce manuscrit.

3- La F5H est nécessaire à la synthèse des unités S. Des expériences de radiomarquage chez le magnolia ont montré que l'alcool coniférylique pouvait conduire à l'alcool sinapylique, à l'origine de l'unité S (Chen *et al.*, 1999). Parallèlement, des études biochimiques sur l'activité F5H ont montré, qu'*in vitro*, cette enzyme présentait une affinité mille fois supérieure pour le coniferaldéhyde et l'alcool sinapylique que pour l'acide férulique (Humphreys *et al.*, 1999). Toutes ces données suggèrent que la F5H agit au niveau du coniferaldéhyde et de l'alcool sinapylique, bien plus bas dans le métabolisme des phénylpropanoïdes que ce qui était supposé. Cette hypothèse a été appuyée par le fait que la COMT recombinante de nombreuses espèces végétales est plus efficace, dans la majorité des cas, avec pour substrat le 5-hydroxyconiferaldéhyde, le produit de la F5H (Maury *et al.*, 1999; Humphreys *et al.*, 1999; Osakabe *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Parvathi *et al.*, 2001). Ces résultats suggèrent que la COMT agit bien juste après la F5H dans la conversion du coniferaldéhyde en sinapaldéhyde. Les travaux effectués sur la 4CL vont également dans le même sens, puisque à l'exception de très rares cas, l'enzyme n'accepte pas l'acide sinapique pour substrat (Baucher *et al.*, 1998).

4- Une autre grande avancée a été le clonage par Schoch et Coll. (2001), puis Franke et Coll. (2002a, b) de la C3H, responsable de l'hydroxylation en position *meta* de l'acide *p*-coumarique. Puis, par des approches biochimique, histologique et génétique, les deux groupes ont mis en évidence l'implication de cette enzyme dans la lignification, et de manière plus générale son rôle dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Cette découverte est d'autant plus intéressante que la C3H présente une activité très forte vis-à-vis des esters quinique et shikimique de l'acide *p*-coumarique, alors que l'acide *p*-coumarique libre et le *p*-coumaroyl CoA sont de très mauvais substrats. L'analyse de la lignine des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans l'expression de la C3H donne la preuve que les esters quinique et shikimique de l'acide *p*-coumarique constituent des intermédiaires indispensables à la synthèse de la lignine (Franke *et al.*, 2002a, b). Parallèlement, Li et Coll. (2001) ont suggéré, depuis la découverte d'une nouvelle enzyme, une sinapyl alcool déshydrogénase (SAD), que l'étape finale de la synthèse des unités S ne fasse plus intervenir la CAD, mais la SAD qui serait une enzyme spécifique des Angiospermes.

Le schéma présenté **Fig. 56** constitue une représentation actualisée de la voie de biosynthèse de la lignine chez les Angiospermes. Il est difficile, voire impossible, de concilier l'ensemble des données biochimiques et celles issues de la transgénèse. J'ai volontairement sélectionné certains résultats qui me paraissaient constituer des arguments particulièrement forts. L'ensemble de ces études montre que la voie est plus complexe que prévue et surtout que les esters et les thiolesters d'HCAs jouent un rôle prédominant dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Des données récentes (Schoch *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2002a, b) ont notamment montré l'importance des esters shikimique et quinique de l'acide *p*-coumarique dans la biosynthèse de la lignine. Il s'agit de la première démonstration d'une implication de

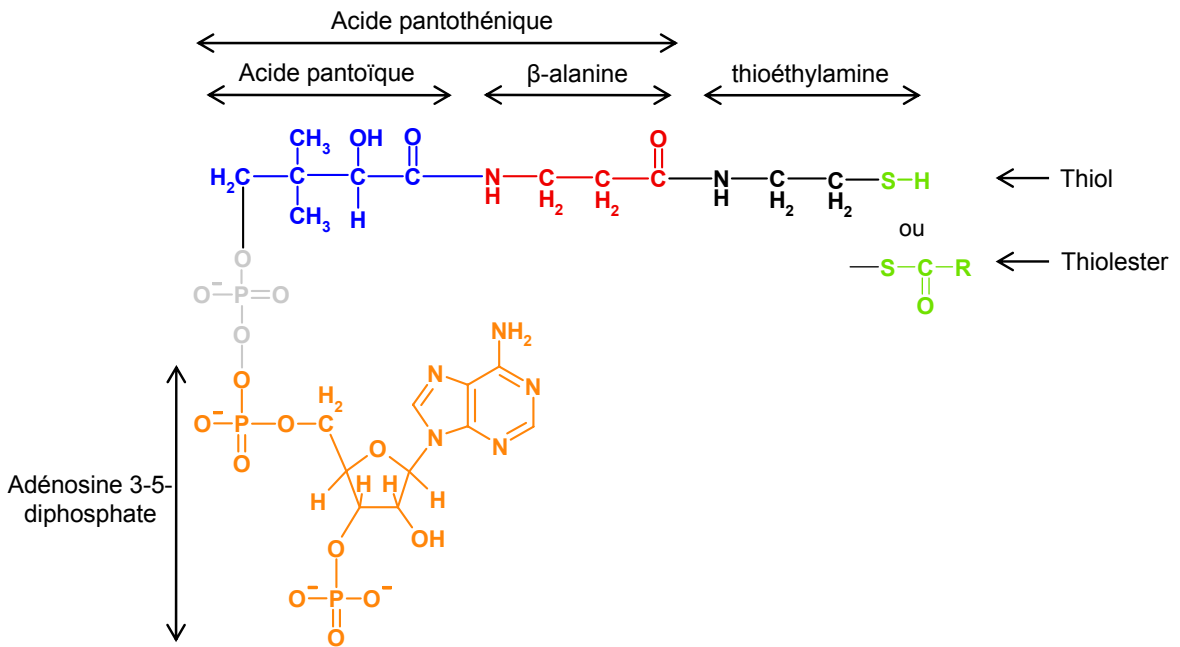


Figure 57. Structure du Coenzyme A.

En vert, le groupement thiol. L'hydrogène peut être substitué par divers radicaux pour donner des thiolesters de formule (R-S-CO-R'), le caféoyl-CoA étant un exemple (**Fig. 58**). C'est la liaison thiolester qui constitue la partie active de la molécule.

En noir + vert, la thioéthylamine.

En rouge, la β -alanine.

En bleu, l'acide pantoïque.

En orange, le groupement adénosine di-phosphate.

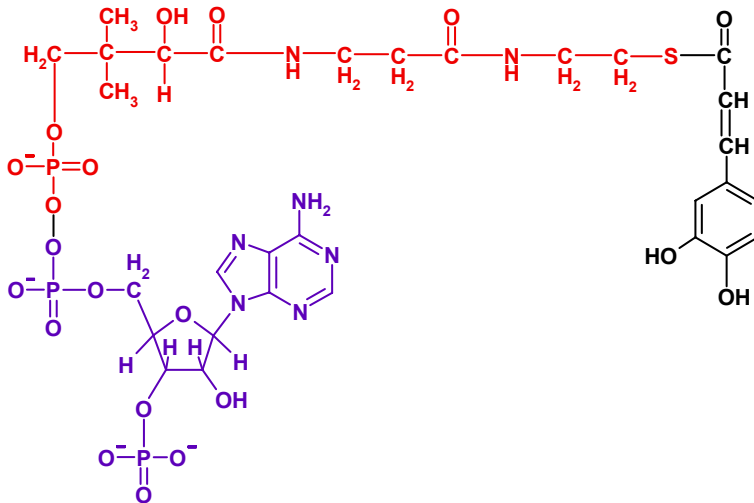


Figure 58. Structure du caféoyl-CoA, un thiolester. La chaîne latérale de CoA correspond aux parties rouge et violette.

En noir, le squelette carboné du caféoyl.

En rouge, la chaîne phosphopanthétique.

En violet, le groupement adénosine di-phosphate.

composés dérivant de la voie du shikimate en tant qu'intermédiaires métaboliques dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Cette découverte implique tout d'abord l'existence d'au moins une enzyme, représentée par le point d'interrogation **Fig. 56**, capable de synthétiser les substrats de la C3H. Cette enzyme, à activité acyltransférase, a été caractérisée au laboratoire et fera l'objet du premier chapitre de ce manuscrit. De plus, le rôle essentiel de ces esters nécessite une relation étroite entre le métabolisme primaire de la voie du shikimate et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes. Afin d'essayer de comprendre comment ces deux voies métaboliques peuvent être interconnectées, je présenterai dans la dernière partie de l'introduction (paragraphe 3.) la voie du shikimate.

2.7 Le coenzyme A ou « coenzyme d'Acylation »

Le CoA ou « Coenzyme d'Acylation » intervient dans le transfert de groupements acylés lors de diverses réactions enzymatiques. Il dérive d'une vitamine du groupe B, l'acide pantothénique, qui est combiné, d'une part à un phosphate lié par une liaison pyrophosphate à une molécule d'adénosine 3'-5' diphosphate, et d'autre part à une molécule de thioéthylamine dérivée de la cystéine (**Fig. 57**). C'est le groupement thiol (-SH) de cette dernière qui est la partie active de la molécule. En effet, l'hydrogène est mobile et peut être substitué par différents radicaux acyles formant ainsi des composés thioesters (**Fig. 58**). La réactivité de la liaison thioester est grande. En effet, l'énergie libérée par l'hydrolyse de cette liaison est comparable à celle libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP en ADP. Ces thioesters sont importants en biochimie et interviennent en particulier dans le cycle de Krebs (acétyl-CoA), le métabolisme des acides gras (acyl-CoA), des glucides, des stérols et des acides aminés.

En particulier chez les plantes, le métabolisme des phénylpropanoïdes fait intervenir des esters de CoA comme intermédiaires de la biosynthèse de divers composés phénoliques tels que la lignine, les flavonoïdes, les anthocyanes et les isoflavonoïdes. Ce rôle d'intermédiaire des esters de CoA est connu depuis plusieurs années pour les réactions d'estérification (Stöckigt et Zenk, 1974; Rhodes et Woollorton, 1976), mais aussi pour les étapes de réduction menant aux monomères de la lignine (Gross *et al.*, 1973; Ebel et Grisebach, 1973) ainsi que pour la synthèse du squelette des flavonoïdes (Kreuzaler et Hahlbrock, 1975). L'importance de la voie alternative des esters de CoA dans la biosynthèse de la lignine a été démontrée par les travaux de Ye et Coll. (1994) sur des cellules de mésophylle de *Zinnia* en culture au cours de leur différenciation en cellules de trachées lignifiées. En particulier, ces auteurs ont montré que la CCoAOMT, qui produit du féruloïl-CoA, était impliquée dans la biosynthèse de la lignine. D'autre part, certains de ces esters de CoA comme le féruloïl-CoA et le sinapoyl-CoA sont directement incorporés dans la paroi cellulaire lors des réactions de défense aux agents pathogènes (Grisebach, 1981; Legrand, 1983; Schmitt *et al.*, 1991; Ishii, 1997).

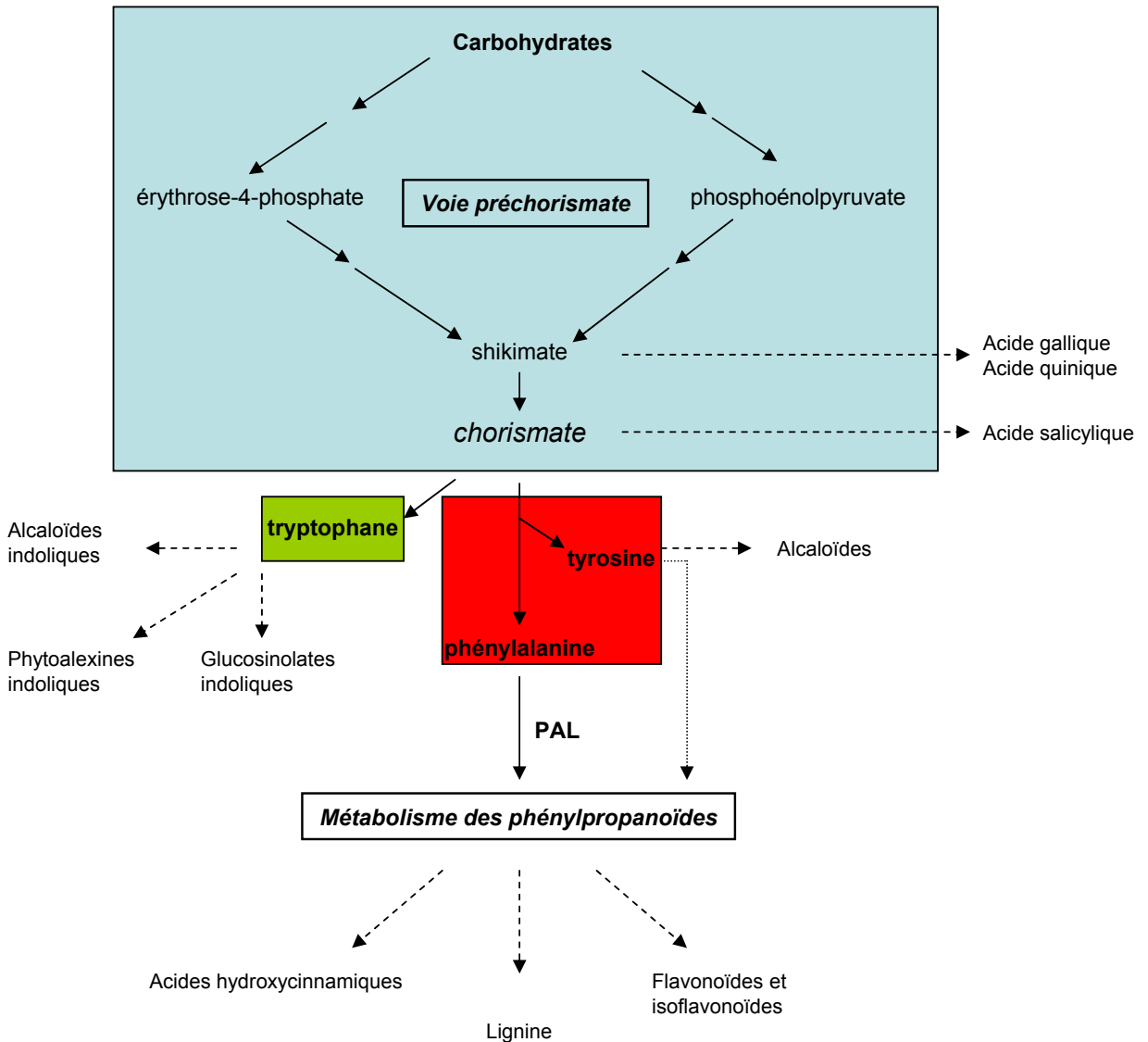


Figure 59. La voie du shikimate chez les plantes.

En bleu : la voie préchorismate.

En vert : la branche conduisant à la synthèse du tryptophane.

En rouge : la branche conduisant à la phénylalanine et à la tyrosine.

La 4-coumarate CoA ligase (4CL), strictement dépendante de l'ATP, catalyse la formation des esters de CoA de plusieurs acides cinnamiques (Boudet *et al.*, 1995) puis de nombreuses enzymes utilisent ces thioesters pour former divers composés phénoliques (**Fig. 3**). En particulier, le *p*-coumaroyl-CoA constitue un point de branchement important entre la voie générale des phénylpropanoïdes et les voies spécifiques (Legrand, 1983), notamment vers la synthèse des flavonoïdes, des anthocyanes, des isoflavonoïdes ou vers celle des monomères de lignine. La caractérisation d'une nouvelle enzyme, à activité acyltransférase dépendante des esters de CoA (Chapitre I), ainsi que l'étude « structure/fonction » de l'interaction d'une OMT de tabac avec son substrat, le caféoyl-CoA (Chapitre II), mettent en lumière l'importance des esters HCA de CoA en tant qu'intermédiaires dans le métabolisme des phénylpropanoïdes.

3. La voie du shikimate

3.1 Importance de la voie métabolique du shikimate

La voie du shikimate est présente uniquement chez les bactéries, les champignons et les plantes. Les animaux ne possèdent pas cette voie métabolique, ceci ayant pour conséquence que les acides aminés aromatiques doivent faire partie intégrante de leur alimentation. La spécificité de ce métabolisme aux microorganismes et aux plantes supérieures a conduit à la recherche et à l'obtention de nouveaux antibiotiques et herbicides ayant pour cibles moléculaires des enzymes intervenant dans cette voie (Herrmann et Weaver, 1999).

Dans les conditions normales de croissance, 20% du carbone fixé par les plantes passe par la voie du shikimate. Cette dernière lie le métabolisme des carbohydrates à la voie de biosynthèse des composés aromatiques en conduisant à la synthèse de la structure de base, le noyau aromatique (**Fig. 3 et 59**). Dans une succession de sept étapes métaboliques, le phosphoenolpyruvate (PEP; un intermédiaire de la glycolyse) et l'érythrose 4-phosphate (E4P; un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates) sont convertis en chorismate, le précurseur des acides aminés aromatiques (Phe, Tyr et Trp) et d'un certain nombre de métabolites secondaires indoliques et aromatiques. Ces composés sont nécessaires à des fonctions aussi variées que la protection aux U.V., le transport des électrons, la signalisation, la communication, la défense des plantes et la réponse à la blessure (Macheroux *et al.*, 1999). Ainsi, à côté de son rôle majeur dans le métabolisme primaire, la voie du shikimate constitue un lien essentiel avec le métabolisme secondaire. En plus de la Phe, tous les intermédiaires de la voie peuvent être considérés comme des points de branchements vers d'autres voies métaboliques. Nous verrons que l'acide quinique, précurseur de l'acide chlorogénique, en est un exemple.

La voie du shikimate est une voie multi-branches qui peut être divisée en trois parties. La voie qui part de PEP et E4P pour arriver au chorismate est appelée voie préchorismate. Puis

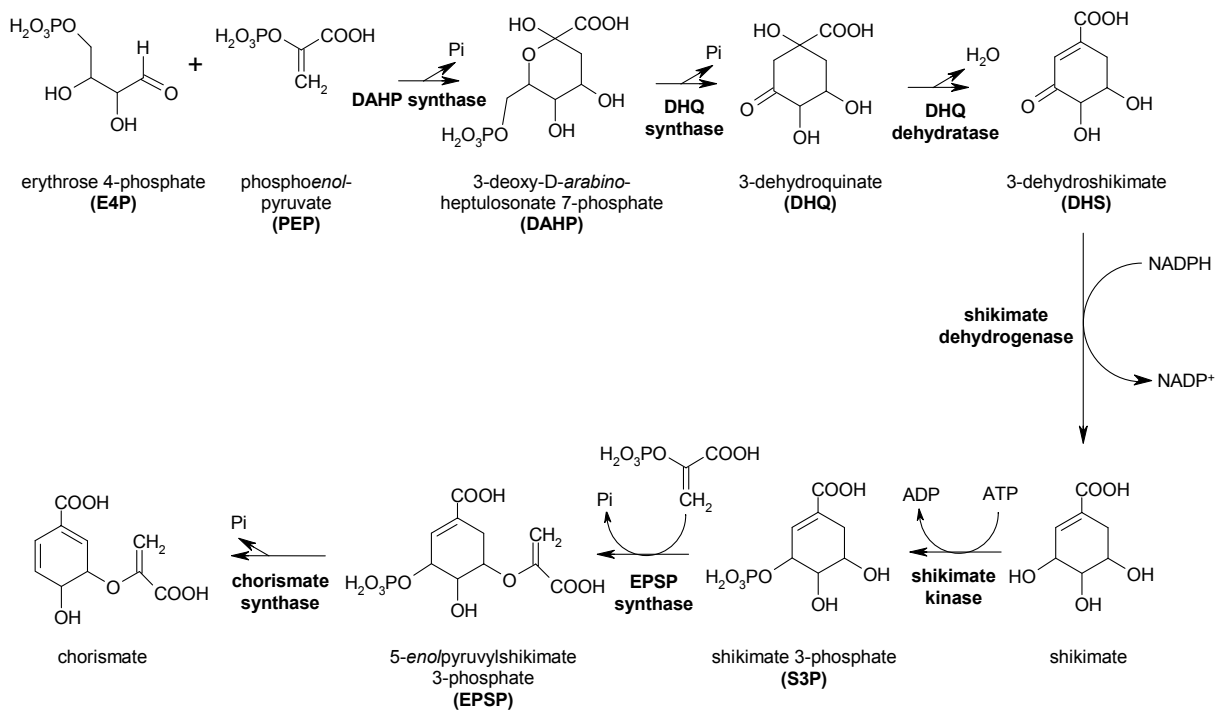


Figure 60. La voie du préchorismate : étapes enzymatiques et intermédiaires métaboliques.

après le chorismate, la voie du shikimate se sépare en deux branches : l'une conduit à la Phe et la Tyr et l'autre au Trp (**Fig. 59**) (Schmid et Amrhein, 1995).

Toutes les enzymes de la voie préchorismate ont été caractérisées et clonées chez plusieurs espèces procaryotiques et eucaryotiques. Les ADNc des plantes supérieures codent pour des protéines avec des séquences d'adressage vers les plastes, suggérant que ceux-ci constituent le lieu unique de la biosynthèse du chorismate.

Chez les procaryotes, la voie du shikimate est régulée par les produits finaux de la voie qui ont des effets inhibiteurs sur l'activité des enzymes situées en amont. La première enzyme de la voie, la DAHP synthase, constitue une cible privilégiée. Chez les microorganismes eucaryotiques, la biosynthèse des acides aminés aromatiques est sujette à un contrôle plus général de l'expression des différentes enzymes (et isoformes) par l'action de facteurs de transcription. Une telle régulation semble également avoir lieu chez les plantes supérieures (Guyer *et al.*, 1995). Plusieurs enzymes de la voie existent sous forme d'isoenzymes dont l'expression varie en fonction des conditions environnementales et d'un organe à l'autre.

3.2 Les enzymes de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques

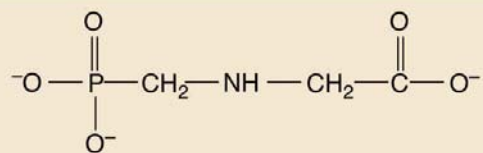
3.2.1 Les enzymes du tronc principal, la voie préchorismate

La voie du shikimate débute par la condensation de deux métabolites phosphorylés, le PEP et l'E4P appartenant à la machinerie générale de la cellule. Chez les plantes, les 7 réactions enzymatiques conduisant à la synthèse du chorismate sont catalysées par 6 enzymes (**Fig. 60**). Celles-ci ont toutes été purifiées à partir de différentes espèces végétales et leurs ADNc isolés (Weaver et Herrmann, 1997).

3.2.1.1 La 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase

Cette enzyme réalise la condensation du PEP et de l'E4P pour produire le DAHP et libérer une molécule de phosphate inorganique.

Chez les plantes, plusieurs isoformes ont été caractérisées. Des tests de complémentation de mutants de levure avec des gènes d'*Arabidopsis* codant pour des DAHP synthases ont été réalisés et ont permis de démontrer la fonction biologique des DAHP synthases. Des stimuli tels que la lumière, la blessure ou l'élicitation induisent l'expression de certaines de ces isoformes (Herrmann et Weaver, 1999). De façon concomitante, une augmentation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est observée. L'acide gibbéréllique et l'acide jasmonique régulent également l'expression des isoformes de la DAHP synthase et le mécanisme de régulation majoritaire semble se faire au niveau transcriptionnel.



Glyphosate

(N-[Phosphonomethyl]glycine)

Figure 61. Structure du glyphosate, un herbicide commercial ayant pour cible l'EPSP synthase et agissant comme un inhibiteur compétitif. (Buchanan *et al.*, 2001).

3.2.1.2 La 3-déhydroquinone (DHQ) synthase

Cette enzyme catalyse l'élimination d'un atome de phosphate de la DAHP et l'échange intramoléculaire d'un atome d'oxygène avec le carbone 7 pour donner le DHQ. Il s'agit d'une réaction complexe. Les plantes supérieures semblent coder pour une seule DHQ synthase dont le profil d'expression est identique à celui d'une isoenzyme de la DAHP synthase (Herrmann et Weaver, 1999). L'induction du gène *DHQ synthase* par un éliciteur fongique (*P. megasperma*) a également été démontrée.

Les cinq prochaines étapes vont servir à introduire une chaîne latérale et deux des trois doubles liaisons du noyau aromatique (Herrmann, 1995).

3.2.1.3 La 3-déhydroquinone (DHQ) déshydratase et shikimate déshydrogénase

Chez les plantes supérieures les réactions 3 et 4 (**Fig. 60**) sont catalysées par une enzyme bi-fonctionnelle : la 3-déhydroquinone déshydratase - shikimate déshydrogénase. Elle catalyse la déshydratation du DHQ en DHS, puis la réduction du DHS en shikimate. Plusieurs isoformes ont été purifiées et l'expression de certaines est induite par la blessure (Bischoff *et al.*, 2001). Les trois étapes restantes de la voie du shikimate sont catalysées par des enzymes distinctes.

3.2.1.4 La shikimate kinase

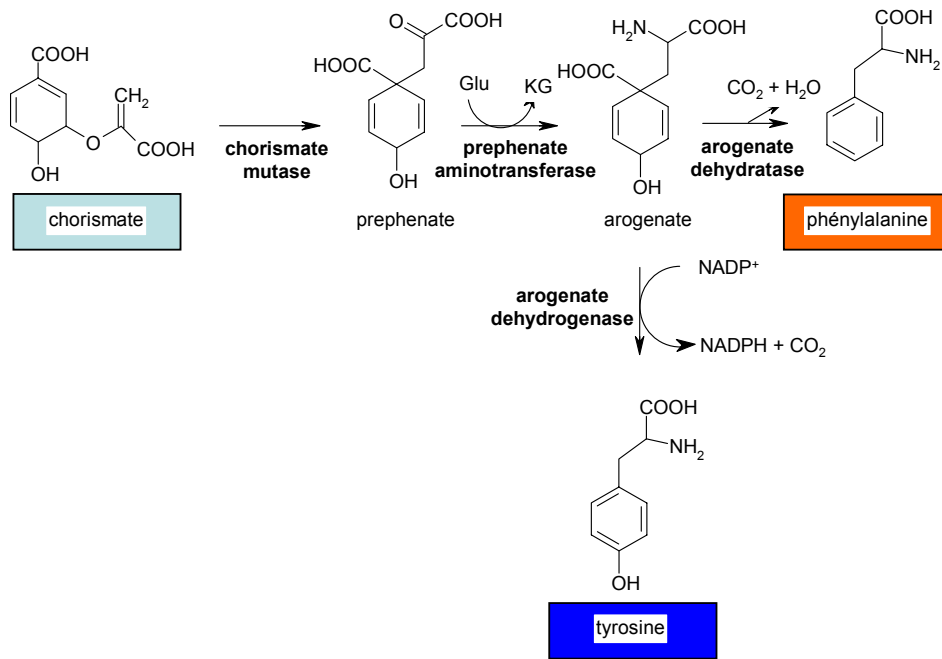
La shikimate kinase catalyse la phosphorylation du shikimate pour donner le shikimate 3-phosphate (S3P). Une seule isoforme a été caractérisée chez les plantes supérieures .

3.2.1.5 La 5-énolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) synthase

Cette étape constitue le second point d'entrée dans la voie du shikimate d'une molécule de PEP; elle est condensée avec le S3P pour donner l'EPSP et libérer une molécule de phosphate inorganique. La EPSP synthase a été clonée chez plusieurs espèces végétales. Les protéines possèdent toutes à leur extrémité Nt un peptide de transit permettant une localisation plastidiale. Des expériences réalisées *in vitro* sur des chloroplastes purifiés ont permis de confirmer l'importation des protéines dans le plaste. L'expression d'une des deux isoformes de EPSP synthase de tomate est induite par l'élicitation (Herrmann et Weaver, 1999).

L'EPSP synthase est l'unique cible cellulaire de l'herbicide glyphosate. La molécule active est le N-[phosphonomeéthyl] glycine et se fixe uniquement sur l'enzyme complexée avec le S3P et entre en compétition avec le PEP (**Fig. 61**). Son action est à spectre large chez les

A



B

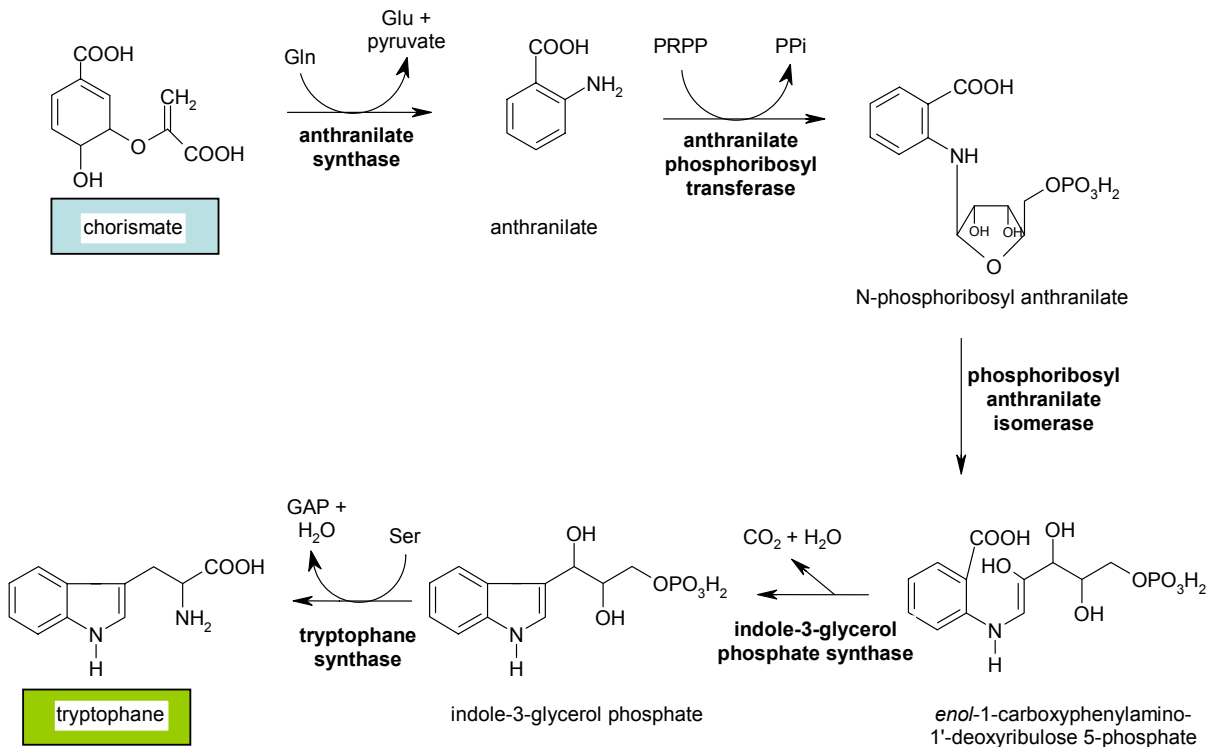


Figure 62. Voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques à partir du chorismate.

A : voie de biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine.

B : voie de biosynthèse du tryptophane.

plantes supérieures, mais la sensibilité des plantes est variable. En général, les isoformes de plantes sont plus sensibles au glyphosate que celles de bactéries. Des plantes transgéniques tolérantes au glyphosate ont été obtenues grâce à l'expression d'isoformes bactériennes ou à la surexpression de l'enzyme de plante (soja, coton, betterave à sucre).

3.2.1.6 *La chorismate synthase*

La septième et dernière étape de la voie shikimate consiste en une *trans*-1,4 élimination du phosphate du EPSP pour conduire au chorismate. A cette étape, la seconde des trois doubles liaisons du noyau benzène est introduite. Ainsi, le chorismate est le précurseur de la majorité des composés contenant un noyau aromatique. L'expression de la chorismate synthase est importante dans les fleurs et les racines et est induite par l'élicitation fongique (Herrmann et Weaver, 1999).

3.2.2 Les enzymes conduisant à la synthèse de la phénylalanine et de la tyrosine (Fig. 62A)

La chorismate mutase (CM), qui catalyse le réarrangement intramoléculaire de la chaîne latérale du chorismate pour synthétiser le préphénate, est une enzyme commune à la biosynthèse de la tyrosine et la phénylalanine. Chez de nombreuses plantes supérieures cette enzyme est présente sous deux isoformes différentes, CM1 et CM2, qui sont régulées de manières assez différentes. La CM1 est inhibée par la phénylalanine et la tyrosine. Cet effet inhibiteur est reversé par le tryptophane, le produit final de l'autre branche de la voie, qui active la CM1. Cette co-régulation permet de contrôler le flux des deux voies en compétition. Par contre, la CM2 ne semble pas soumise à une régulation de type allostérique et contrairement à la CM1, qui est localisée dans le chloroplaste, la CM2 est cytosolique (Buchanan *et al.*, 2001). Le rôle de la CM2 dans les plantes reste à déterminer. Par sa localisation dans le cytoplasme, cette isoforme pourrait jouer un rôle régulateur du flux de la voie du shikimate vers le métabolisme des phénylpropanoïdes.

La dernière étape commune de la biosynthèse de la phénylalanine et de la tyrosine est catalysée par la préphénate aminotransférase. Cette enzyme utilise l'acide glutamique et l'acide aspartique comme donneur d'amine et synthétise l'arogénate.

Puis l'arogénate est convertit en tyrosine par l'arogénate déshydrogénase ou en phénylalanine par l'arogénate déhydratase.

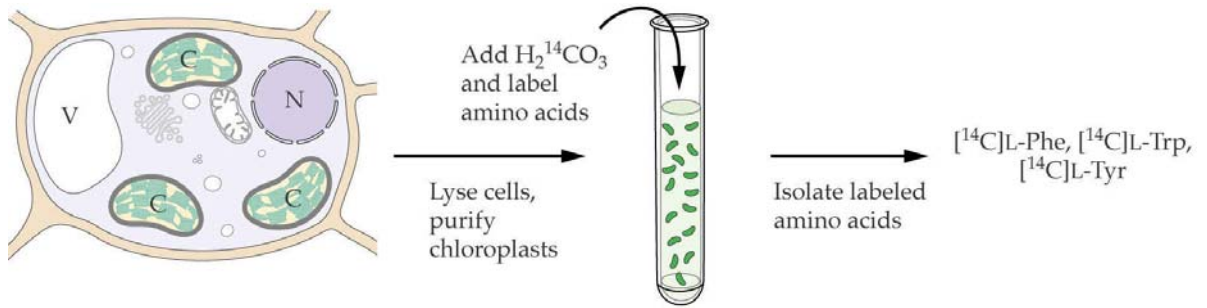


Figure 63. Mise en évidence de la synthèse des acides aminés aromatiques à partir de chloroplastes (C) isolés. (Buchanan *et al.*, 2001).

Conversion de CO₂ marqué (C¹⁴) en phénylalanine, tyrosine et tryptophane marqués. Les chloroplastes possèdent l'ensemble des enzymes nécessaires pour la biosynthèse des acides aminés aromatiques. V, vacuole; N, noyau.

3.2.3 Les enzymes conduisant à la synthèse du tryptophane (**Fig. 62B**)

La conversion du chorismate en tryptophane joue un rôle important au-delà de la biosynthèse des acides aminés. En effet, les plantes utilisent cette voie pour produire les précurseurs de nombreux métabolites secondaires, tels que l'auxine, les alcaloïdes indoliques (vinblastine, morphine), des phytoalexines (camalexine) et les glucosinolates indoliques (**Fig. 59**). Ces métabolites servent de facteurs de croissance, de molécules de défense ou encore de molécules signal vis-à-vis des insectes pollinisateurs et des herbivores. Certains alcaloïdes ont une valeur pharmacologique élevée puisqu'ils possèdent notamment des propriétés anticancéreuses, telle la vinblastine.

La voie de biosynthèse du tryptophane fait intervenir six enzymes et 5 intermédiaires métaboliques. Les deux premiers intermédiaires sont l'antranilate et le 5-phosphoribosyl-antranilate. Ces deux composés ont la particularité de présenter une fluorescence bleue sous lumière U.V. lorsqu'ils s'accumulent en grande quantité. Cette caractéristique a été utilisée comme technique de criblage pour élucider, par une approche génétique, la voie de biosynthèse du tryptophane. Les gènes des six enzymes ont été caractérisés et des mutants d'*Arabidopsis* pour cinq de ces gènes ont été identifiés. La première enzyme de cette voie, l'antranilate synthase, est soumise à un contrôle allostérique et régule les pools de tryptophane.

3.3 Localisation subcellulaire de la voie du shikimate

Il est aujourd'hui établi et reconnu que la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques est localisée dans les plastes (Herrmann, 1995). En effet, un certain nombre d'arguments biochimiques et moléculaires conforte cette idée. Tout d'abord, des études biochimiques ont révélé que la biosynthèse complète des acides aminés aromatiques pouvait se faire *in vitro* à l'aide de chloroplastes isolés d'épinard ou d'orge (**Fig. 63**) (Leuschner et Schultz, 1991). De plus, chez les plantes, les ADNc de toutes les enzymes de la voie du shikimate codent pour des protéines avec à leur extrémité Nt une extension caractéristique de séquence de transit vers les chloroplastes. Il a même été démontré *in vitro* que certaines de ces enzymes étaient exportées dans les chloroplastes isolés, et que d'autres ne présentaient une activité enzymatique qu'une fois maturées.

Mais l'activité DAHP synthase a également été détectée dans le cytoplasme. A partir de cette découverte, deux compartiments pour la localisation subcellulaire de la voie du shikimate ont été proposés : le cytoplasme et le plaste. Pour expliquer cette double localisation, il a été proposé que le chloroplaste pourrait être responsable de la production des acides aminés aromatiques, alors que la voie cytosolique serait responsable de la production du chorismate nécessaire à la synthèse des métabolites secondaires puisque les enzymes de la voie de

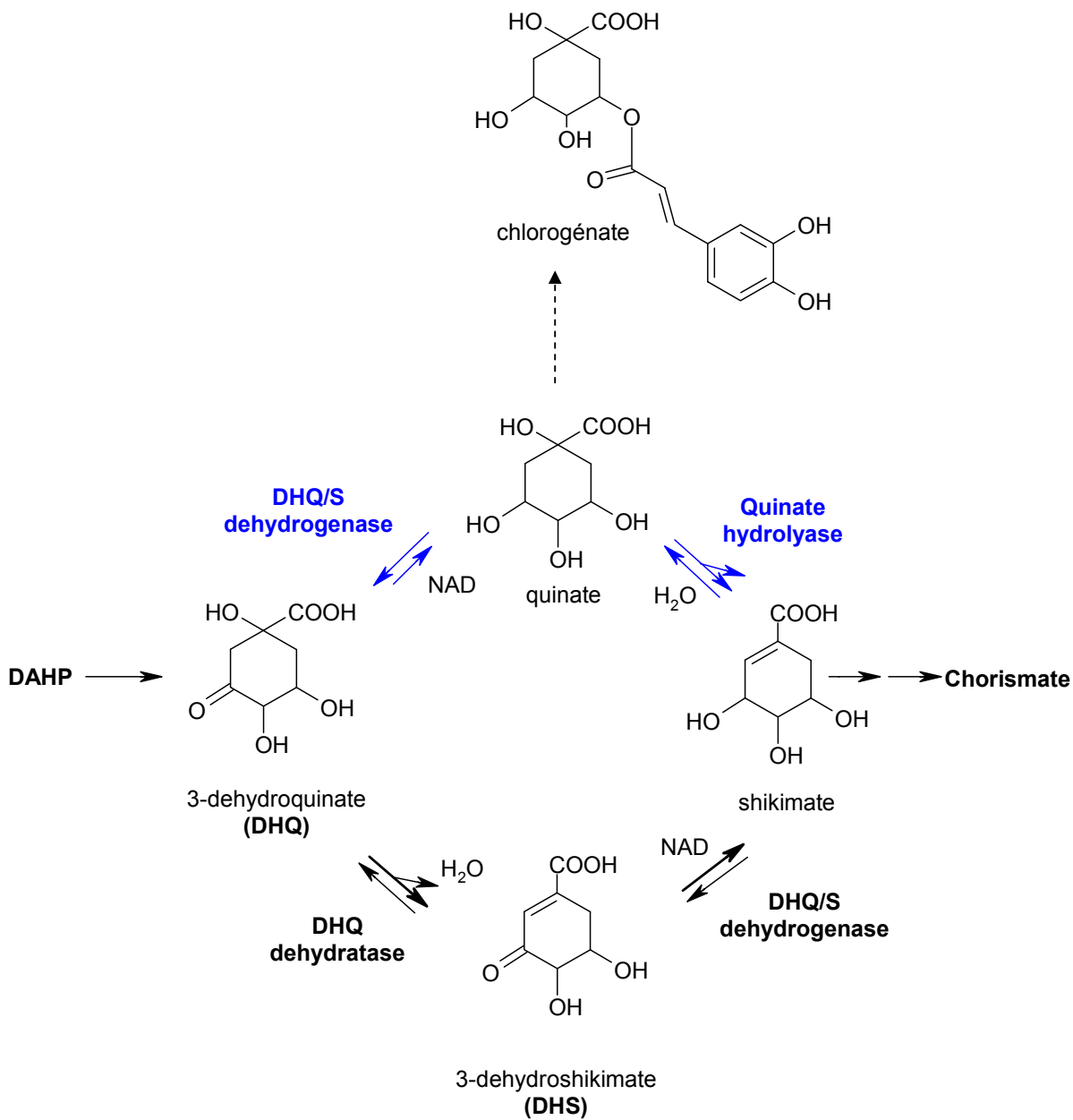


Figure 64. Le cycle du quinate.

En noir : les enzymes de la voie du préchorismate.

En bleu : les enzymes du métabolisme du quinate.

biosynthèse des phénylpropanoïdes sont localisées dans le cytoplasme ou dans la membrane du RE (Weaver et Herrmann, 1997).

Bien que la voie cytosolique reste une piste intéressante à étudier, seule la voie du shikimate localisée dans les plastes a clairement été démontrée jusque là.

3.4 Les produits dérivés et fonctions de la voie du shikimate

La voie du shikimate présente de nombreux points de branchements constitués des métabolites intermédiaires de la voie principale pouvant conduire à la production d'autres composés. Par exemple, la voie du préchorismate est à l'origine de la synthèse de l'acide quinique et de l'acide gallique. Via l'isochorismate, ce métabolisme conduit également à l'acide salicylique (**Fig. 59**; voir paragraphe 1.2.3) (Wildermuth *et al.*, 2001).

Je vais traiter plus précisément du métabolisme de l'acide quinique, même si peu de choses sont connues sur sa régulation. Il utilise des intermédiaires de la voie du shikimate comme substrat, formant une branche à partir du tronc commun (Hermann et Weaver, 1999). L'acide quinique est un composé qui s'accumule chez certaines espèces végétales et servirait de forme de stockage et de transport de carbone alicyclique pour la biosynthèse des composés aromatiques (Leuschner et Schultz, 1991). Mais chez les plantes supérieures, l'acide quinique est surtout le précurseur de l'acide chlorogénique (CGA) (voir paragraphe 1.2.3). Le CGA est le produit de la condensation de l'acide quinique et de l'acide caféique, c'est-à-dire une combinaison entre un intermédiaire précoce de la voie du shikimate et un intermédiaire plus lointain du métabolisme des phénylpropanoïdes.

Les plantes auraient au moins deux moyens différents de synthétiser l'acide quinique en utilisant deux intermédiaires métaboliques de la voie principale du shikimate; soit à partir du 3-déhydroquinone (DHQ), soit à partir de l'acide shikimique (Hermann et Weaver, 1999).

La conversion complète et réversible de DHQ en acide quinique est catalysée par la quinate déshydrogénase, une enzyme NAD dépendante. Cette enzyme est sujette à une régulation post-transcriptionnelle, par phosphorylation réversible d'un résidu sérine par une Calmodulin-Dependante Protéine Kinase.

L'acide quinique peut également être synthétisé à partir de l'acide shikimique sous l'action d'une quinate hydrolyase, qui catalyse, de façon réversible, l'addition ou l'élimination d'une molécule d'eau (Leuschner *et al.*, 1995).

La quinate déshydrogénase et la quinate hydrolyase sont localisées dans le chloroplaste. Les deux réactions sont réversibles, ainsi l'acide quinique pourrait également réintégrer la voie principale du shikimate en étant converti soit en DHQ, soit en acide shikimique. Les 3 enzymes présentées **Fig. 64** forment ce qu'on appelle le cycle de l'acide quinique. Aucune donnée n'est disponible sur la régulation de ces enzymes ou sur leurs activités relatives dans les voies de synthèse ou de dégradation de l'acide quinique. De plus, les deux précurseurs du CGA, l'acide quinique et l'acide caféique, sont synthétisés dans deux compartiments cellulaires différents.

L'élucidation du mode de régulation de la biosynthèse de l'acide chlorogénique reste donc un défi à relever.

Le 5-O-(4-coumaroyl) shikimate constitue un autre exemple de composé synthétisé à la fois à partir d'un intermédiaire de la voie du shikimate et d'un métabolite dérivé du métabolisme des phénylpropanoïdes. L'hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate hydroxycinnamoyl transférase qui catalyse la trans-estérification de l'acide shikimique et du 4-coumaroyl-CoA en 5-O-(4-coumaroyl) shikimate avait été partiellement caractérisée (Ulbrich et Zenk, 1980; Koch *et al.*, 1990). La localisation subcellulaire de cette enzyme n'a pas été déterminée. Une grande partie de mon travail de thèse a été consacrée à cette enzyme et sa fonction dans le métabolisme des phénylpropanoïdes (Chapitre I).

3.5 Régulation de la voie du shikimate en réponse à des stimuli développementaux et environnementaux

Les bactéries utilisent près de 90% de leur énergie métabolique pour la biosynthèse des protéines. Pour la majorité des procaryotes, les trois acides aminés aromatiques représentent pratiquement la totalité du devenir de la biosynthèse aromatique et leur concentration intracellulaire régule la voie du shikimate.

Chez les plantes supérieures, les acides aminés aromatiques sont les précurseurs d'un large éventail de métabolites secondaires et de nombreux changements dynamiques se produisent dans la séquence métabolique au cours de la vie de la plante (Hermann, 1995). La modulation du flux de carbone est nécessaire pour répondre aux variations de la demande en métabolites primaires et secondaires (Weaver et Herrmann, 1997). Les profils d'expression des gènes de la voie du shikimate varient, d'un tissu à l'autre, au cours du développement et en réponse à des stimuli environnementaux. La production de composés phénoliques via l'induction simultanée des enzymes de la voie du shikimate et celles du métabolisme des phénylpropanoïdes constitue une réponse générale aux stress (Görlach *et al.*, 1995).

En tant que première enzyme de la voie shikimate, la DAHP synthase de plante constitue un candidat pour être un élément régulateur de la voie. Des expériences réalisées *in vitro* n'ont pas permis de considérer que la DAHP synthase pouvait faire l'objet d'un contrôle de type allostérique par les acides aminés aromatiques. Mais il a été montré au travers de nombreuses études que la régulation de la DAHP synthase se faisait au niveau transcriptionnel (Pinto *et al.*, 1988) : par exemple, au cours de la floraison ou de la croissance des racines, pour assurer la synthèse protéique, mais aussi la synthèse de polymères tels que la lignine. Ainsi, une corrélation de l'activité DAHP synthase avec celles des enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes a souvent été observée (Dyer *et al.*, 1989; Weaver et Herrmann, 1997). La coordination des métabolismes Shikimate / Phénylpropanoïdes / Flavonoïdes en réponse à la lumière est illustrée par une induction simultanée de la DAHP synthase, la PAL et de la chalcone synthase (Weaver et Herrmann, 1997; Logemann *et al.*, 2000).

Les enzymes de la voie du shikimate présentent également une réponse marquée aux attaques d'herbivores et aux agents pathogènes, qui peut être mimée par la blessure (Dyer *et al.*, 1989) et les éliciteurs fongiques (McCue et Conn, 1989; Keith *et al.*, 1991; Görlach *et al.*, 1995). De nombreuses études ont été réalisées sur la DAHP synthase de pomme de terre, d'*Arabidopsis*, de persil et de tomate (Weaver et Hermann, 1997). Le rôle majeur de la DAHP synthase dans la régulation du flux des métabolites phénylpropanes a été démontré par génie génétique, puisque des pommes de terre transgéniques réprimées pour l'expression de cette enzyme sont perturbées dans la biosynthèse de la lignine (paragraphe 2.5.12) (Jones *et al.*, 1995).

La shikimate kinase peut représenter un second contrôle dans la voie du shikimate. En effet, il a été observé chez les plantes que cette enzyme, qui a pour substrat le shikimate, est soumise à un mécanisme de régulation dépendant du niveau énergétique de la cellule (Schmidt *et al.*, 1990). Un tel contrôle indique que la plante, sous des conditions énergétiques favorables, peut détourner le carbone du shikimate de la voie préchorismate vers l'acide quinique, par exemple grâce à la quinate hydrolyase (voir paragraphe 3.4) (Herrmann, 1995). Ce rôle régulateur a également été proposé pour la shikimate kinase par Görlach et Coll. (1995). Des cultures cellulaires de tomate ont été traitées avec un éliciteur fongique. L'accumulation des ARNm de la shikimate kinase et de la PAL atteint un maximum dès deux heures après élicitation, alors que ceux de la DAHP synthase, de l'EPSP synthase et de la chorismate synthase atteignent leur maximum seulement vers 4-5 heures. L'augmentation de la demande en phénylalanine, pour la synthèse des métabolites secondaires (lignine, subérine, SA ou phytoalexines), semble être satisfaite par une induction précoce et simultanée de l'expression de la shikimate kinase et de la PAL.

Toutes ces données suggèrent une régulation fine et couplée des enzymes clefs dans la synthèse des métabolites primaires et secondaires grâce à des mécanismes de contrôle pouvant réguler l'expression de plusieurs enzymes. Au-delà de la régulation de type transcriptionnel, la notion de régulation de type rétrocontrôle a été abordée par Yao et Coll. (1995). Ces derniers ont montré, en surexprimant chez la pomme de terre une Tryptophane Décarboxylase (TDC), que le tryptophane régulait le flux de carbone à travers le métabolisme des phénylpropanoïdes en exerçant un contrôle positif sur le pool de Phe.

De plus, cette régulation étroite amène une autre question : comment l'approvisionnement en E4P et PEP est-il géré? L'E4P est le produit de la transketolase (TK), une enzyme qui catalyse des réactions dans le cycle de Calvin et la voie oxydative des pentoses phosphates. Des expériences récentes ont montré que l'inhibition de l'expression de la TK dans des tabacs transgéniques avait des effets multiples que ce soit sur la photosynthèse, la synthèse des acides aminés aromatiques ou sur l'accumulation des intermédiaires métaboliques (HCAs) et des produits (CGA, lignine) du métabolisme des phénylpropanoïdes (Henkes *et al.*, 2001). Le coefficient de contrôle de la TK sur le flux du métabolisme des phénylpropanoïdes a été

estimé à 0.7, valeur similaire à celle mesurée lors de la répression de la PAL (Bate *et al.*, 1994; Sewalt *et al.*, 1997a). Ces données suggèrent l'absence de route alternative et indiquent, bien au contraire, une voie de régulation bien définie partant du métabolisme des carbohydrates, en passant par la voie shikimate jusqu'au métabolisme des phénylpropanoïdes et ses dérivés.

Comme cela a été récemment démontré, certains composés de la voie shikimate, tels que les acides quinique et shikimique, s'avèrent également essentiels à la synthèse des phénylpropanes, non pas seulement en tant que précurseurs de la Phe, mais également en tant qu'intermédiaires métaboliques sous la forme d'esters d'acides hydroxycinnamiques (*p*-coumaroyl-shikimate substrat de la C3H; voir paragraphes 1.3.3 et 2.5.3) (Schoch *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2001a, b). L'existence de telles interconnexions et la compartimentation distincte que ce soit des enzymes ou des diverses molécules soulèvent de nombreuses interrogations sur les mécanismes de régulation.

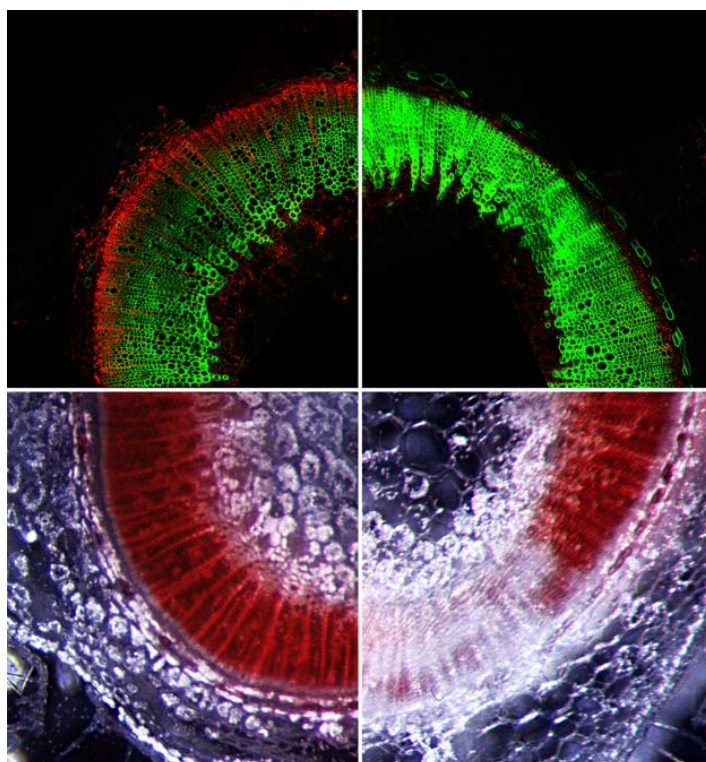
Objectifs des travaux de thèse

La découverte récente de nouveaux intermédiaires métaboliques, les esters shikimique/quinique d'acides *p*-coumarique et caféique respectivement substrat et produit de la C3H, soulève une question en particulier : existe-t-il une enzyme spécifique impliquée dans la synthèse de ces esters? Un de nos objectifs a été de caractériser cette nouvelle enzyme du métabolisme des phénylpropanoïdes chez une plante modèle, le tabac. Le premier chapitre sera consacré à ces travaux. Ceux-ci ont été possibles grâce à la découverte au laboratoire d'une activité d'hydrolyse de la liaison thiolester de dérivés hydroxycinnamoyl-CoA dans des extraits bruts de tige de tabac (Maury, 2000). Sur la base de cette activité « thiolesterase », une partie de mon travail de thèse a consisté à cloner le gène correspondant et à caractériser biochimiquement le produit du gène. Les tests d'activité enzymatique réalisés *in vitro* sur la protéine recombinante nous ont permis de conclure que nous venions d'isoler l'acyltransférase « HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quininate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT) » capable de synthétiser les substrats de la C3H. Afin de démontrer l'implication de cette enzyme dans le métabolisme des phénylpropanoïdes, nous avons étudié son profil d'expression dans différents tissus et sa localisation au niveau des tissus conducteurs. Puis, la fonction biologique de la protéine HCT dans la lignification a été démontrée par une approche de « Virus Induced Gene Silencing » (VIGS).

Dans le cadre de l'étude de la caféoyl-CoA *O*-méthyltransférase (CCoAOMT), nous avons voulu déterminer les bases structurales conférant à cette OMT la particularité de méthyler spécifiquement des esters de CoA du métabolisme des phénylpropanoïdes. Pour réaliser cette étude « structure/fonction », nous avons modélisé la structure tertiaire de la CCoAOMT. Des études biochimiques, ainsi qu'une approche de mutagenèse dirigée, nous ont permis de caractériser des acides aminés et des fragments peptidiques essentiels à l'activité enzymatique. Ces résultats seront présentés dans le second chapitre de ce manuscrit.

Chapitre I.

Caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase de tabac, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT).



PARTIE I : Purification, clonage et caractérisation biochimique d'une acyltransférase de tabac contrôlant le pool des esters shikimiques et quiniques, intermédiaires métaboliques de la voie des phénylpropanoïdes. 62

PARTIE II : La répression du gène *HCT*, grâce à l'infection par un virus recombinant (approche de « Virus Induced Gene Silencing », VIGS), affecte le métabolisme des phénylpropanoïdes et modifie les processus de lignification des tissus conducteurs (figure ci-dessus). 78

CONCLUSIONS 108

PARTIE I.

Purification, clonage et caractérisation biochimique d'une acyltransférase de tabac contrôlant le pool des esters shikimiques et quiniques, intermédiaires métaboliques de la voie des phénylpropanoïdes.

PARTIE I.

Purification, clonage et caractérisation biochimique d'une acyltransférase de tabac contrôlant le pool des esters shikimiques et quiniques, intermédiaires métaboliques de la voie des phénylpropanoïdes.

1. Introduction	62
2. Article 1	65
3. Compléments d'information sur la superfamille « BAHD » des acyltransférases dépendantes des esters de CoA	75

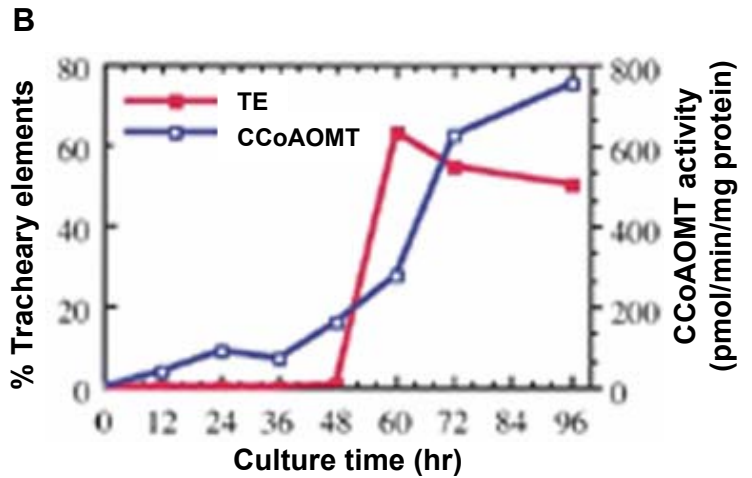


Figure 1. Utilisation du modèle *Zinnia* pour étudier les processus physiologiques et biochimiques liés à la différenciation des cellules du mésophylle en cellules spécialisées du xylème. (Ye *et al.*, 2001).

A : cellule différenciée en « Tracheary element » (TE); notez la formation des spirales, caractéristiques des cellules du xylème (flèche).

B : mise en évidence de l'induction de l'activité CCoAOMT au cours de la formation des « Tracheary element » et de la lignification.

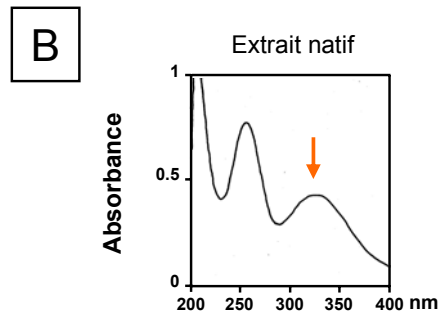
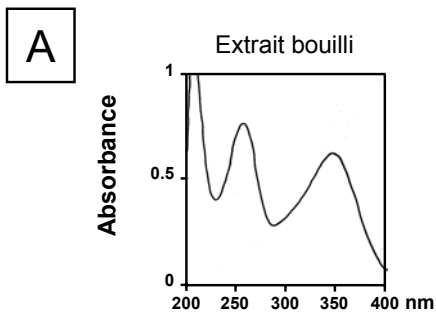


Figure 2. Spectre d'absorption du caféoyl-CoA en présence d'un extrait protéique de tige de tabac.

A : spectre mesuré après incubation du caféoyl-CoA en présence d'un extrait protéique brut bouilli.

B : spectre mesuré après incubation du caféoyl-CoA en présence d'un extrait protéique brut natif.

On observe une diminution du pic d'absorption à 346nm, reflétant une hydrolyse de la liaison thiolester.

PARTIE I: Purification, clonage et caractérisation biochimique d'une acyltransférase de tabac contrôlant le pool des esters shikimiques et quiniques, intermédiaires métaboliques de la voie des phénylpropanoïdes.

1. Introduction

La découverte d'une nouvelle activité enzymatique de type « acyltransférase » a été initiée par l'étude de la CCoAOMT, à la suite des résultats obtenus avec les tabacs transgéniques inhibés pour la COMT I (Atanassova *et al.*, 1995). En effet, la lignine de ces plantes se caractérise par une diminution des unités S, alors que la teneur en unités G n'est pas modifiée (**Fig. 50**). Ces résultats indiquaient qu'une autre enzyme, non affectée par la transformation, catalysait la première étape de méthylation menant à l'acide férulique et à l'unité G de la lignine. Une bonne candidate était la CCoAOMT déjà caractérisée dans d'autres espèces végétales telles que le persil (Pakusch *et al.*, 1991) ou Zinnia (Ye *et al.*, 1994). Cette enzyme catalyse la méthylation du caféoyl-CoA en féruloyl-CoA en utilisant la SAM comme donneur de méthyle (**Fig. 27**). Son implication dans la biosynthèse de la lignine a été démontrée dans des cellules de mésophylle de Zinnia en culture au cours de leur différenciation en cellules spécialisées du xylème. Dans ces cellules, Ye et Coll. (1994, 2001) ont montré une forte stimulation de l'activité CCoAOMT lors de la différenciation et de la lignification des trachées (**Fig. I 1.**). L'un des objectifs du groupe a donc été de caractériser cette nouvelle enzyme chez le tabac et de déterminer son rôle dans la plante. Le clonage (Martz *et al.*, 1998) puis l'expression hétérologue des différentes isoformes de CCoAOMT de tabac (Maury *et al.*, 1999) ont ainsi été réalisés.

Au début de ces études biochimiques de l'activité CCoAOMT, Françoise Martz et Stéphane Maury ont été amenés à mettre au point un test d'activité enzymatique utilisant le caféoyl-CoA pour substrat et des extraits protéiques bruts de tabac (Martz, 1997). Mais il fallait répondre à la question préalable : quelle est la stabilité des esters de CoA en présence d'un extrait brut de tabac? Pour cela, des esters de CoA ont été mis en présence d'extraits bruts, et leur stabilité suivie par spectrophotométrie. Les spectres d'absorption dans l'U.V. des esters de CoA d'acides hydroxycinnamiques sont caractérisés par deux pics d'absorption (**Fig. I 2A.**) : l'un à 260 nm correspondant à l'absorption de l'adénine du CoA et l'autre entre 311 et 352 nm correspondant à l'absorption de la liaison thiolester. En présence d'un extrait brut de tige et de caféoyl-CoA, on a montré une diminution significative du pic à environ 345 nm indiquant l'hydrolyse de la liaison thiolester (**Fig. I 2B**).

Stéphane Maury puis Pierrette Geoffroy se sont lancés dans la purification de cette protéine à activité « thiolesterase » à partir d'extrait brut de tige en utilisant le test d'activité

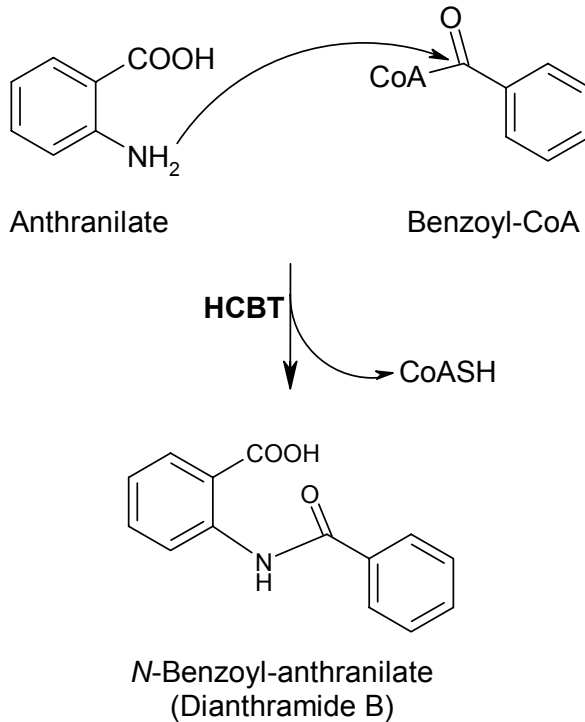


Figure I 3. Réaction enzymatique catalysée par l'anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase (HCBT) d'œillet (numéro d'accèsion, Z84383). Cette enzyme fait partie des premières acyltransférases caractérisées, appartenant à la superfamille « BAHD ». (Yang *et al.*, 1997, 1998; St-Pierre et De Luca, 2000).

```

Tabac      MKIEVKESTMVKPAAETPQQLWNSNVDLVV--PNFHTPSVYFYRP-----TGSPN 49
Oeillet    MSIQIKQSTMVRPAEETPNKSLWLSNIDMILRTPYSHTGAVLIYKQPDNNEINIHPSSSM 60
           *.*:.*:****:* ***: : ** *:*: : : * ** : * :*:      ..*

Tabac      FFDGKVLKEALS KALVPFYPMAGRLCRDEDGRIEIDCKGQGVLFVEAESDGVVDDFGDFA 109
Oeillet    YFDANILIEALS KALVPFYPMAGRLKINGD-RYEIDCNAEGALFVEAESSHVLDFGDGR 119
           :**.:*: ***** : * * *****:.*.*****. *:*****

Tabac      PTLELR-QLIPAVDYSQGIQSYALLVLQITHFKCGVSLGVGMQHHAADGASGLHFINTW 168
Oeillet    PNDELHRVMVPTCDYSKGISSFLLMVQLTRFCGGVSIGFAQH*H*VCDGMAHFENNSW 179
           *. ** : :*: ***:**.*:***:*.*:*:*****:.. :*.*.** : :.* :*

Tabac      SDMARGLDLTIPPFI DRTL-LRARDPPQPQFPHVEYQPPPTLKVTPENTPISEAVPETS 227
Oeillet    ARIAKGLLPAL E PVDHRYLHLRPRNPPQIKYSHSQFEP----FVPSLPNELLDGKTNKSQ 235
           : :*:** :. * . ** * **.*:*** :.* :*: * .. . : . . :.*

Tabac      SIFKLRDQINTL KAKSKEDGNTVNYSSYEMLAGHVWRSTCMARGLAHDQETKLYIATDG 287
Oeillet    TLFILSREQINT LKQKLDLSNNTTRLSTYEVVAHVWRSVSKARGLSDHEEIKLIMPVDG 295
           :.* *:*:***** * . ..**.. *:***:*.*****. *****:..* ** :.* **

Tabac      RSRLR-PSLPPGYF GNVIFTTTPIAVAGDIQSKPIWYAASKLHDALARMDNDYLRSALDY 346
Oeillet    RSRINNPSLPK GYCGNVVFLAVCTATVGDLS CNPLTDTAGKVQEALKGLDDDYLRSAIDH 355
           ***:. **** * ***: * . * ..**.:*: :*.*:.* ** :*:*****:*

Tabac      LELQPD LKALVRG-AHTFKCPNLGITSWSRLP IHDADFGWGRPIFMGPGGIAYEGLSFIL 405
Oeillet    TESKPGLPVPY MG SPEKTLYPNVLVNSWGRIPYQAMDFGWGSPFFGISNIFYDGQCFLI 415
           * :.* * . * ... ***: :*.**.*: * :***** * *:* ..* *:* :*:

Tabac      PSPTNDGSQSVA ISLQAEHMKLF EKFLYDFZ 436
Oeillet    PSRDGDGSMTLAINLFSSHLSRFK KYFYDFZ 446
           ** .*** :*:.* :.*. *:***:****

```

Figure 4. Alignement des séquences protéiques entre l'acyltransférase d'œillet (HCBT; numéro d'accèsion, Z84383) et l'enzyme caractérisée chez le tabac (HCT; numéro d'accèsion, AJ507825). Les deux enzymes présentent 46% d'identité et 62% de similarité. (*) représente les acides aminés identiques entre les deux séquences et (.) et (.) le degré de similarité entre les acides aminés. Les motifs « HxxxD » et « DFGWG » sont caractéristiques des acyltransférases membres de la superfamille « BAHD ». (Yang *et al.*, 1997, 1998; St-Pierre et De Luca, 2000).

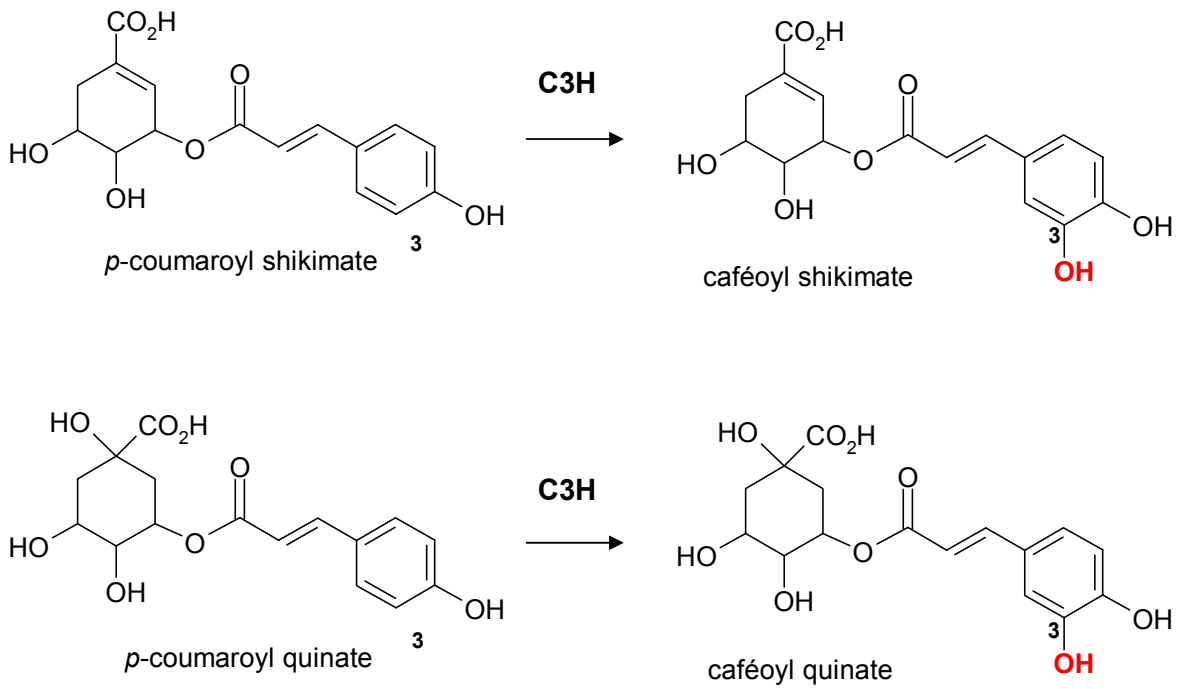
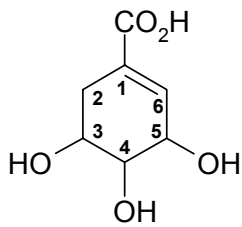


Figure I 5. Etape enzymatique catalysée par la C3H; réaction d'hydroxylation en position 3 du noyau aromatique. *In vitro*, la C3H est active vis-à-vis des esters sikimique et quinique d'acide *p*-coumarique (Schoch *et al.*, 2001).

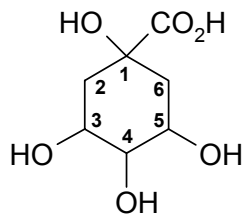
spectrophotométrique. Le séquençage de l'extrémité Nt d'une protéine présente dans la fraction active a permis d'obtenir une séquence d'une vingtaine d'acides aminés. Lorsque cette séquence a été confrontée aux banques protéiques, elle présentait 88% de similarité avec une acyltransférase d'œillet conduisant à la biosynthèse de phytoalexines, les dianthramides (Yang *et al.*, 1997, 1998). Ces molécules s'accumulent chez l'œillet en réponse à l'infection par divers agents pathogènes. En 1989, Ulrich Matern mettait en évidence l'induction d'une activité *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase (HCBT) à l'origine de la biosynthèse des dianthramides. La réaction enzymatique consiste à transférer un groupement hydroxycinnamoyl sur l'antranilate, un précurseur de la biosynthèse du tryptophane (**Fig. 62**), pour libérer le CoA et donner une dianthramide (**Fig. I 3**). En 1997, le gène correspondant était cloné et les études biochimiques confirmaient l'activité « acyltransférase ». Cette enzyme fait partie d'une nouvelle famille d'acyltransférases dépendantes des esters de CoA découvertes chez les plantes et les champignons (St-Pierre *et al.*, 1998). Je reviendrai sur cette superfamille un peu plus loin (compléments d'information page 75). Ses membres sont notamment caractérisés par la présence, dans la séquence codante, de régions conservées. Sur la base de ces motifs consensus, l'utilisation de primers dégénérés et une approche de RT-PCR, m'a permis de cloner l'ADNc complet du gène de tabac. L'ADNc code pour une protéine de 435 acides aminés. L'alignement de cette protéine de tabac avec celle d'œillet révèle 46% d'identité entre les deux protéines, et parmi les acides aminés strictement conservés, on retrouve les motifs consensus caractéristiques de la superfamille des acyltransférases (**Fig. I 4**) : le motif « HxxxD », caractéristique des acyltransférases qu'elles soient d'origine animales ou végétales, et le motif « DFGWG » de fonction inconnue.

Le produit du gène, que nous avons cloné, présente les caractéristiques structurales d'une acyltransférase et non celles d'une thiolesterase. En fait, cette enzyme hydrolyse bien la liaison thiolester d'un ester de CoA mais pour transférer le groupement acyle correspondant sur un accepteur. Les composés synthétisés par l'HCBT d'œillet, les dianthramides, n'étant pas connus chez le tabac, il paraissait peu probable que l'enzyme de tabac synthétise ce type de métabolites.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les esters de CoA d'acides hydroxycinnamiques jouent un rôle clef dans le métabolisme des phénylpropanoïdes, notamment dans la voie conduisant aux flavonoïdes et aux précurseurs de la lignine. Depuis peu, le rôle d'une acyltransférase chez le tabac est fortement soupçonné. En effet, il a récemment été identifié et cloné chez *Arabidopsis* le cytochrome P450 catalysant l'étape d'hydroxylation en position 3 du noyau phénolique (voir paragraphes 1.3.3. et 2.5.3.) (Schoch *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2002a). Les études de spécificité de substrat ont montré que cette enzyme était peu efficace aussi bien vis-à-vis de l'acide *p*-coumarique que du *p*-coumaroyl-CoA. Par contre, les esters quinique et shikimique d'acide *p*-coumarique se sont avérés être



Acide shikimique



Acide quinique

Figure I 6. Les acides shikimique et quinique, dérivant du métabolisme primaire du préchorismate (paragraphe 3.4). Ces composés sont des substrats potentiels de l'enzyme clonée chez le tabac, en tant qu'accepteur du groupement *p*-coumaroyl, pour fournir les substrats de la C3H.

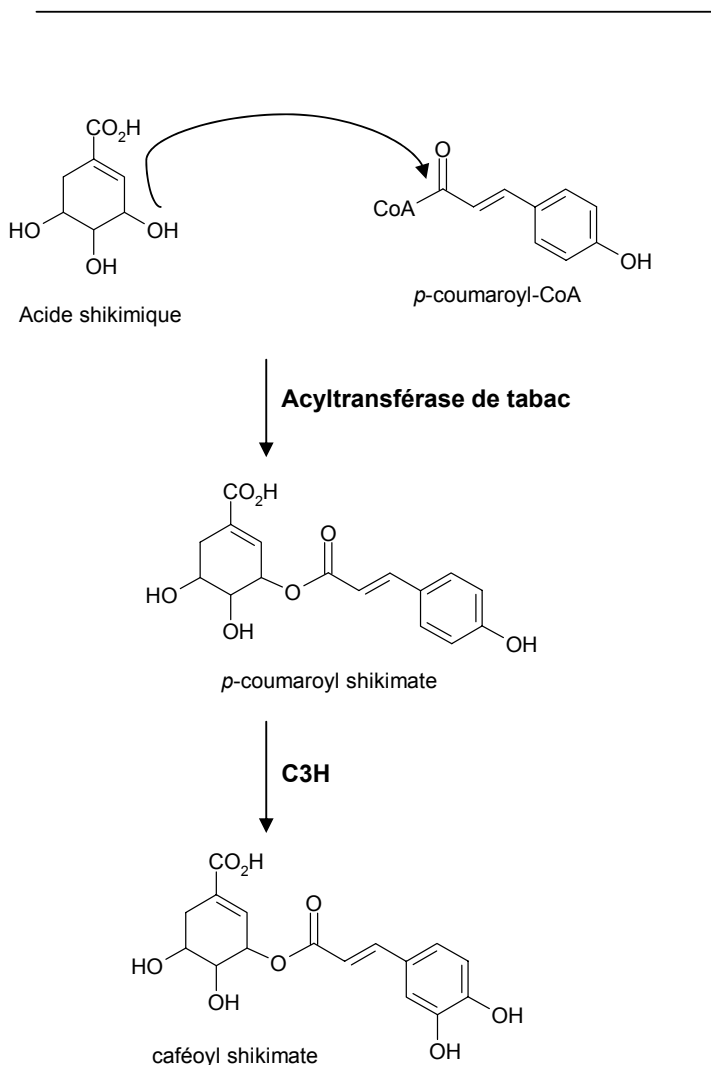


Figure I 7. L'enzyme de tabac, présente des similarités de séquence avec des membres de la superfamille des acyltransférases « BAHD », et est capable de catalyser la réaction de trans-estérification entre l'acide shikimique et le *p*-coumaroyl-CoA. Cette étape enzymatique permet de synthétiser les substrats de la C3H et constituerait le chaînon manquant dans la voie de biosynthèse conduisant aux précurseurs de la lignine.

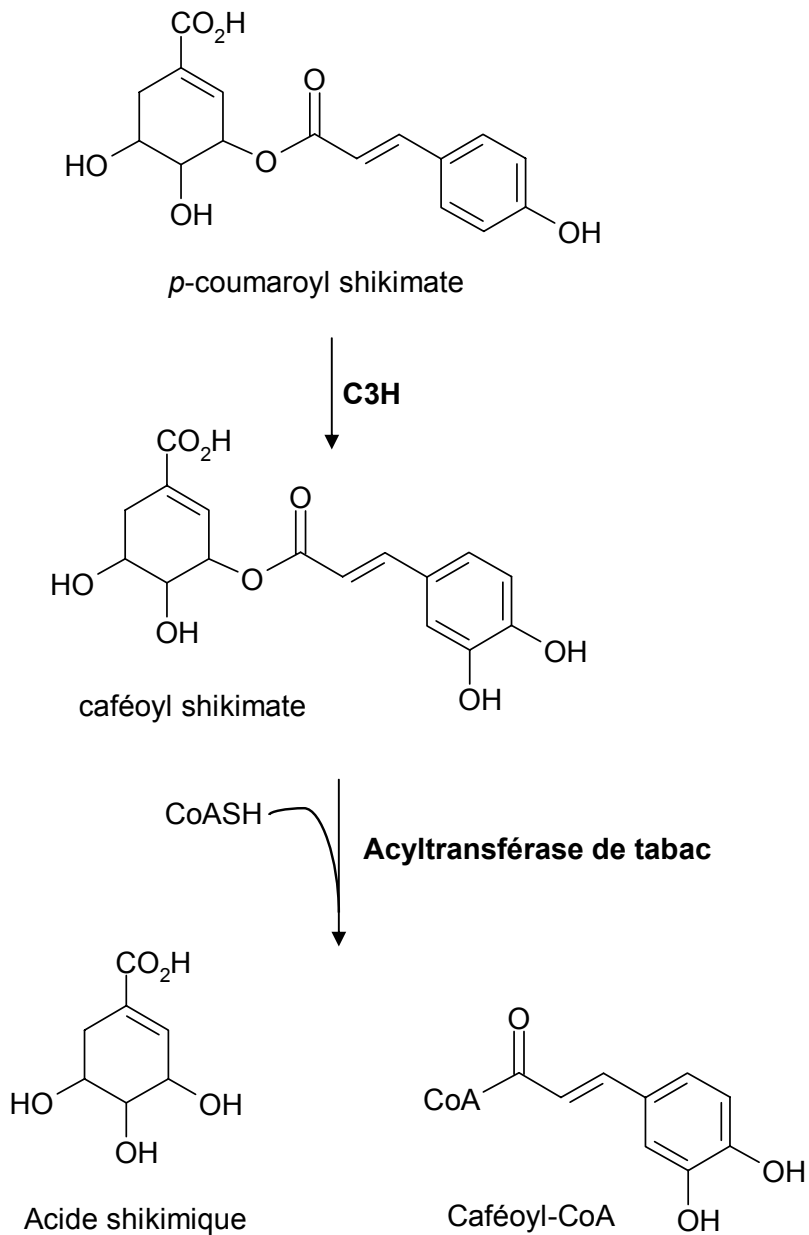


Figure I 8. La réaction catalysée par l'acyltransférase de tabac (HCT), est réversible. Après l'étape d'hydroxylation catalysée par la C3H, HCT hydrolyse le produit de la C3H pour libérer, en présence de CoASH, le caféoyl-CoA.

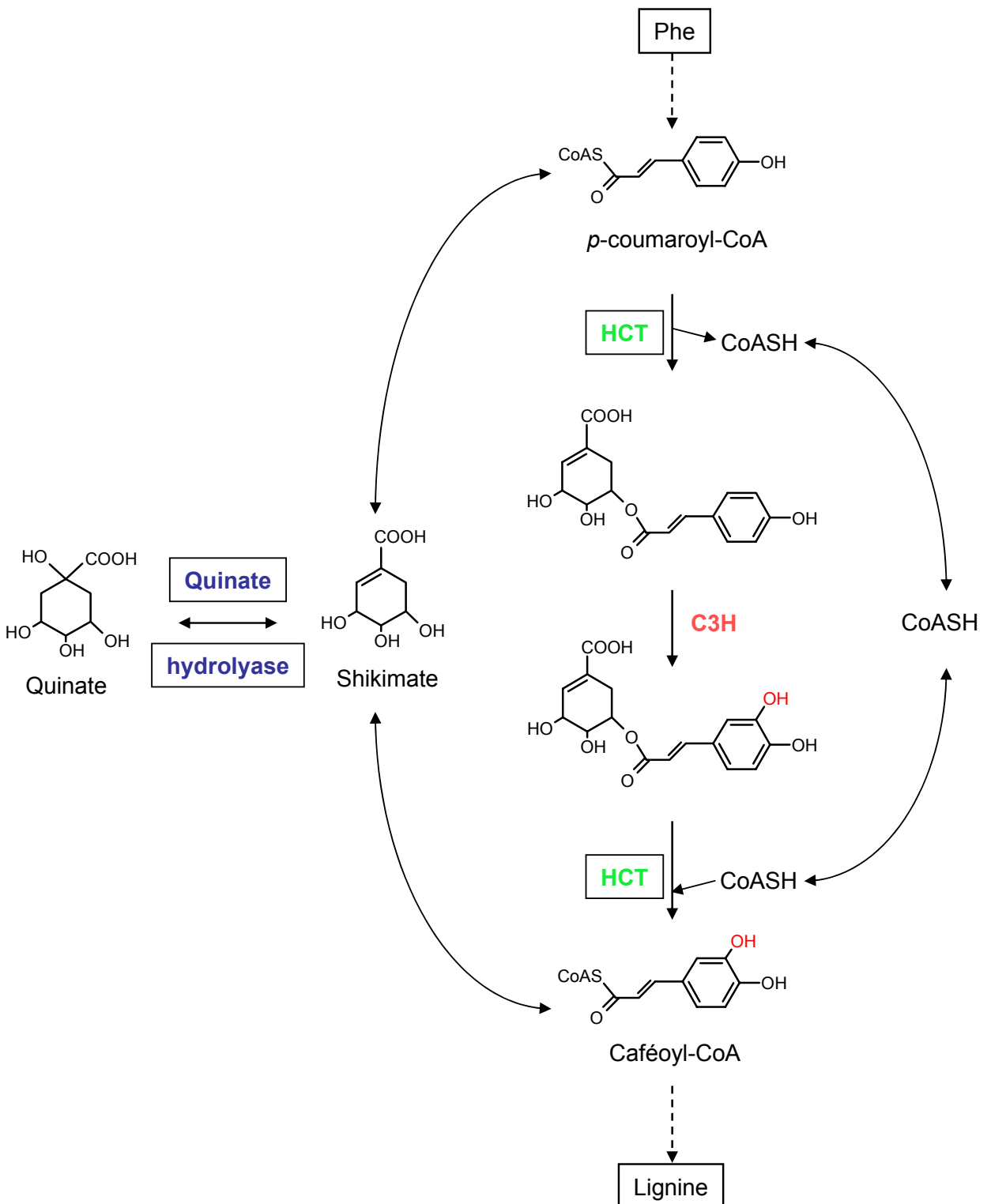


Figure I 9. Rôle catalyseur des acides quinique et shikimique et du CoA lors des réactions catalysées par l'acyltransférase de tabac (HCT). L'enzyme HCT synthétise les substrats de la cinnamate 3-hydroxylase (C3H) puis prend en charge les produits de la C3H, les esters d'acide caféique, pour synthétiser le caféoyl-CoA. Ce dernier subit les réactions de méthylation, d'hydroxylation et de réduction pour conduire aux unités monomériques de la lignine.

d'excellents substrats pour la C3H (**Fig. I 5**). Il restait donc à caractériser l'enzyme catalysant le transfert du *p*-coumaroyl-CoA sur ces accepteurs, le quinate et le shikimate, pour donner les esters (**Fig. I 6**). L'enzyme qu'on venait de cloner, présentant des homologues avec les acyltransférases dépendantes des esters de CoA, était un bon candidat pour remplir ce rôle.

L'enzyme de tabac a été exprimée dans un système hétérologue, *E. coli*, puis purifiée à homogénéité pour réaliser des études biochimiques. Nous avons tout d'abord testé comme substrat le *p*-coumaroyl-CoA susceptible d'être transféré sur le shikimate ou le quinate. Les produits de réaction ont été identifiés par CLHP. *In vitro*, l'enzyme est capable de synthétiser le *p*-coumaroyl-shikimate et le *p*-coumaroyl-quinat (**Fig. I 7**). Cette enzyme possède donc bien l'activité acyltransférase permettant de synthétiser les substrats de la C3H. Nous avons testé d'autres donneurs et accepteurs d'acyle. Les meilleurs donneurs d'acyles sont le *p*-coumaroyl-CoA et le caféoyl-CoA alors que le meilleur accepteur semble être de façon assez nette le shikimate par rapport au quinate. L'antranilate, l'accepteur de l'enzyme d'œillet (HCBT), n'est pas substrat de l'enzyme de tabac. Ces résultats nous permettent de dire que l'enzyme que nous avons cloné est une acyltransférase possédant une activité HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinat hydroxycinnamoyl Transférase ou HCT.

Mais est ce que la même enzyme est capable d'hydrolyser ces esters, autrement dit est ce que la réaction est réversible? Pour répondre à cette question nous avons testé comme substrat le caféoyl-quinat c'est-à-dire l'acide chlorogénique (CGA) (**Fig. 10**), un ester qui est disponible commercialement. Et en présence de CoASH, l'HCT est capable d'hydrolyser le CGA pour libérer le 5-caféoyl-CoA (**Fig. I 8**). Or, il faut aussi savoir que le CGA est la forme phénolique la plus abondante chez certaines plantes, dont le tabac. Ce résultat est très important puisqu'il montre que le CGA, la forme de stockage, peut être mobilisé: sous l'action d'HCT, l'hydrolyse du CGA permet de libérer le caféoyl-CoA une forme métaboliquement active, puisqu'il est le substrat de la CCoAOMT (**Fig. 27 et I 8**).

En résumé, l'enzyme que nous avons caractérisée serait capable à la fois de synthétiser les substrats de la C3H, et une fois l'hydroxylation réalisée, de synthétiser en présence de CoASH, le caféoyl-CoA. Ainsi, les acides shikimique, quinique et le CoA auraient un rôle catalyseur puisqu'ils sont constamment recyclés. Il faut savoir par ailleurs que les acides quinique et shikimique sont en équilibre grâce à une seule enzyme : la quinate hydrolyase (**Fig. I 9 et Fig. 64**).

En conclusion, nous avons caractérisé une nouvelle acyltransférase de tabac impliquée dans le métabolisme secondaire. Elle possède une activité HCT qui semble jouer un rôle clef dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article 1.

2. Article 1. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism.

The Journal of Biological Chemistry

Vol. 278, No. 1, pp. 95-103, 2003

Purification, Cloning, and Properties of an Acyltransferase Controlling Shikimate and Quinate Ester Intermediates in Phenylpropanoid Metabolism*

Received for publication, September 12, 2002, and in revised form, October 11, 2002
Published, JBC Papers in Press, October 14, 2002, DOI 10.1074/jbc.M209362200

Laurent Hoffmann, Stéphane Maury‡, Françoise Martz§, Pierrette Geoffroy,
and Michel Legrand¶

From the Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Université Louis Pasteur, 12, rue du Général Zimmer,
67000 Strasbourg, France

A protein hydrolyzing hydroxycinnamoyl-CoA esters has been purified from tobacco stem extracts by a series of high pressure liquid chromatography steps. The determination of its N-terminal amino acid sequence allowed design of primers permitting the corresponding cDNA to be cloned by PCR. Sequence analysis revealed that the tobacco gene belongs to a plant acyltransferase gene family, the members of which have various functions. The tobacco cDNA was expressed in bacterial cells as a recombinant protein fused to glutathione S-transferase. The fusion protein was affinity-purified and cleaved to yield the recombinant enzyme for use in the study of catalytic properties. The enzyme catalyzed the synthesis of shikimate and quinate esters shown recently to be substrates of the cytochrome P450 3-hydroxylase involved in phenylpropanoid biosynthesis. The enzyme has been named hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase. We show that *p*-coumaroyl-CoA and caffeoyl-CoA are the best acyl group donors and that the acyl group is transferred more efficiently to shikimate than to quinate. The enzyme also catalyzed the reverse reaction, i.e. the formation of caffeoyl-CoA from chlorogenate (5-*O*-caffeoyl quinate ester). Thus, hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase appears to control the biosynthesis and turnover of major plant phenolic compounds such as lignin and chlorogenic acid.

Phenylpropanoid compounds are derived from phenylalanine by the action of phenylalanine ammonia-lyase, the branch point enzyme between primary and secondary metabolism (see Fig. 1) (1, 2). The biosynthesis of phenylpropanoids is developmentally activated in specific tissues and cell types and also in response to biotic and abiotic stimuli such as wounding, pathogen infection, and ultraviolet irradiation (1, 3–5). Cinnamic acid, the reaction product of phenylalanine ammonia-lyase catalysis, is further modified by the action of hydroxylases and

O-methyltransferases, leading to the synthesis of a wide range of hydroxycinnamic acids (see Fig. 1). The enzyme 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase catalyzes the formation of CoA esters of hydroxycinnamic acids, which are activated intermediates in the biosynthesis of diverse compounds via specific branches of the pathway leading to lignins, lignans, flavonoids and isoflavonoids, stilbenes, coumarins, and numerous esters and amides (see Fig. 1) (6, 7). 4-Hydroxycinnamoyl-CoA ligase from various plant species accepts *p*-coumarate, ferulate, and caffeate as substrates in this decreasing preferential order, but does not accept sinapate (8, 9). Thus, it is likely that sinapoyl-CoA is formed via the alternative pathway involving caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase, which produces feruloyl-CoA (10, 11), which is the substrate of cinnamoyl-CoA reductase, the first committed enzyme of monolignol synthesis (see Fig. 1). Recently, it has been shown that coniferaldehyde, the product resulting from cinnamoyl-CoA reductase action, is a preferential substrate for the cytochrome P450 hydroxylase that introduces the hydroxyl group in the 5-position of the aromatic ring (see Fig. 1) (12, 13). Finally, the second methylation reaction leading to syringyl lignin subunits may occur at the level of CoA ester, aldehyde, or alcohol derivatives (see Fig. 1) (10, 13, 14).

Very recently, it has been demonstrated that C-3 hydroxylation does not take place at the free acid level, as is the case for C-4 hydroxylation. By a functional genomics approach, *p*-coumarate 3-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* has been shown to be a P450 enzyme that accepts the shikimate and quinate esters of *p*-coumarate as substrates, but not the free acid form or the *p*-coumaroyl-CoA ester (15). Mutants tagged in the *p*-coumarate 3-hydroxylase gene are characterized by a reduced epidermal fluorescence phenotype (and called *ref8*) and have been shown to accumulate *p*-coumarate esters and to be affected in lignin biosynthesis, thus providing direct evidence that *p*-coumaroyl shikimate and/or *p*-coumaroyl quinate is probably an important intermediate in the phenylpropanoid pathway (16, 17).

Here, we report the characterization of an acyltransferase from tobacco that uses *p*-coumaroyl-CoA as acyl donor and shikimic acid or quinic acid as acceptor, yielding the shikimate or quinate ester, respectively. The enzyme has been purified from tobacco stems, and determination of its N-terminal sequence allowed us to clone the cognate cDNA by PCR. The tobacco enzyme shares 46% identity with the carnation anthranilate benzoyl-CoA benzoyltransferase, which catalyzes anthranamide phytoalexin biosynthesis (18) and belongs to a large plant acyltransferase gene family (19). The recombinant enzyme expressed in *Escherichia coli* efficiently synthesizes *p*-coumaroyl esters from *p*-coumaroyl-CoA, in agreement with a

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) AJ507825.

‡ Present address: Lab. de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, Faculté des Sciences, Université d'Orléans, 45067 Orléans Cedex 2, France.

§ Present address: Finnish Forest Research Inst., Rovaniemi Research Station, 96301 Rovaniemi, Finland.

¶ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-8841-7280; Fax: 33-3-8861-4442; E-mail: michel.legrand@ibmp-ulp.u-strasbg.fr.

putative role upstream of *p*-coumarate 3-hydroxylase in the phenylpropanoid pathway. It also catalyzes the biosynthesis of chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic ester), one of the most widespread soluble phenolic compound in the plant kingdom. The tobacco acyltransferase can also catalyze the reverse reaction, *i.e.* transfer of the caffeoyl moiety of chlorogenic acid to CoA to form caffeoyl-CoA, the precursor of guaiacyl and syringyl units of lignin. Thus, in plants, hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase (HCT)¹ appears to play a critical role in the phenylpropanoid pathway, both upstream and downstream of the 3-hydroxylation step.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and Enzymes

Commonly used chemicals and reagents were of the highest purity readily available. Bradford protein dye reagent was purchased from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Restriction enzymes and buffers were purchased from New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) or Invitrogen (Cergy Pontoise, France). T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase, ATP, and purified oligonucleotides used for cloning and DNA sequencing were purchased from Invitrogen. Glutathione-agarose, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, and LB broth were purchased from Sigma. DNA amplification using *Taq* polymerase (Invitrogen) was performed in the iCyclerTM thermocycler (Bio-Rad). Plasmid and PCR products were extracted and purified from agarose gels using kits purchased from QIAGEN Inc. (Hilden, Germany).

Bacterial Strains and Plasmids

Cloning into the pGEX-KG vector (Amersham Biosciences) and PCR screening for positive clones were carried out as described by Martz *et al.* (20). Protein expression was performed using *E. coli* BL21-G612, a kanamycin-resistant strain. *E. coli* BL21-G612 cells carry the plasmid pLysS and express rare prokaryotic tRNAs.

DNA Sequencing

DNA sequencing was performed using the rhodamine dye terminator cycle ready kit with AmpliTaq DNA polymerase FS (PerkinElmer Life Sciences) and an Applied Biosystems DNA sequencer (Model 373A).

Partial Purification of HCT from Tobacco Stems and Amino Acid Sequence Analysis

Preparation of Crude Extracts—Tobacco stems (200 g) were ground at 4 °C in a Waring Blendor in 200 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) containing 15 mM β -mercaptoethanol and 0.2 g of charcoal (Merck). After filtration through four layers of cheesecloth, the homogenate was centrifuged at 10,000 $\times g$ for 30 min. The supernatant was desalted on a Sephadex G-25 column (4 \times 70 cm; Amersham Biosciences) equilibrated with 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) containing 15 mM β -mercaptoethanol (buffer A). The clear supernatant obtained after centrifugation constituted the crude extract.

Anion Exchange Chromatography—The crude extract was loaded onto a Mono Q column (0.5 \times 5 cm; Amersham Biosciences) equilibrated with buffer A. Proteins were eluted with 200 ml of a 0–0.3 M NaCl gradient in buffer A. Active fractions exhibiting HCT activity were pooled.

Molecular Exclusion Chromatography under Fast Protein Liquid Chromatography Conditions—Pooled fractions were concentrated to 200 μ l on Centricon 10 concentrators (Amicon, Inc., Beverly, MA), filtered, injected onto a Superdex 75 HR10/30 column (Amersham Biosciences), and eluted with buffer A at a flow rate of 0.2 ml/min.

Electrophoresis, Protein Staining, and Microsequencing—The basic procedures used for electrophoresis under denaturing conditions and silver nitrate staining have been described (21). After electrophoretic separation under denaturing conditions, proteins were immobilized onto Problott membrane (Bio-Rad), stained with Coomassie Blue (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions, and microsequenced with an Applied Biosystems gas-phase sequencer (Model 470A).

¹ The abbreviations used are: HCT, hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase; RACE, rapid amplification of cDNA ends; HPLC, high pressure liquid chromatography; GST, glutathione *S*-transferase.

Cloning of HCT cDNA

Reverse Transcription—Reverse transcription with total RNA from 2-month-old *Nicotiana tabacum* stems was carried out using poly(dT) primer and SuperscriptTM (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Generation of Partial cDNAs—Partial cDNAs were produced by PCR using cDNA generated by reverse transcription as template. Based on the amino acid sequence of the purified protein, a sense degenerate oligonucleotide primer (SP1) was synthesized (see also Fig. 5): 5'-ATG-GTIAARCCIGCIACIGARACICC-3', where I and R indicate inosine and A/G, respectively. The antisense primer (ASP1) was based upon a conserved region (DFGWG) near the C terminus of acyltransferase proteins (see Fig. 6) and had the following sequence: 5'-CC CCA ICC RAA RTC-3'. DNA amplification was performed under the following conditions: 94 °C for 3 min and then 35 cycles at 94 °C for 1 min, 42 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min. At the end of the 35 cycles, the reaction mixture was incubated for an additional 10 min at 72 °C. The amplified DNA was resolved by agarose gel electrophoresis, and the band of the expected size (1130 bp) was isolated and subcloned into pCRII-TOPO (Invitrogen) prior to sequencing.

5'- and 3'-End Amplification—Based on the nucleotide sequence of the partial cDNA, new oligonucleotide primers were synthesized for amplification of the 5' and 3'-ends of HCT transcripts (see also Fig. 5): ASP2, 5'-GCGCCACACATTTCCTGCCAACATCTCGTAGGAGC-3'; ASP3, 5'-GAAACTGAGGCTGAGGTGGATCACGAGCACGGA-3'; ASP4, 5'-GTCAATGAAAGGTGGGATGGGTGAGGTCAGACC-3'; and SP2, 5'-AGTAAATTACATGATGCATTGGC-3'. To identify the 5'-end of the HCT transcript, the 5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 (Invitrogen) was used. First, ASP2 and total RNA from *N. tabacum* stems were used for cDNA synthesis. Then, a first round of PCR was performed using the nested antisense primer ASP3 along with the anchored RACE-specific primer furnished by the manufacturer. A second round of PCR was performed using 1/100th of the first-round PCR mixture as template and the nested antisense primer ASP4 along with the universal RACE-specific primer (Invitrogen). The amplified DNA was resolved by agarose gel electrophoresis, and the band of the correct size (600 bp) was isolated and subcloned into pCRII-TOPO prior to sequencing. To identify the 3'-end of the HCT transcript, PCR was performed using poly(dT) reverse transcription mixture as template and SP2 and poly(dT) oligonucleotides as primers.

Generation of Full-length HCT cDNA—The sequence information required for generation of a full-length cDNA was derived from the nucleotide sequence of the 5' and 3'-ends of HCT transcripts (see also Fig. 5). The full-length clone was amplified using the end-specific primers SP3 (5'-GCTCTAGACATGAAGATCGAGGTGAAAGAATCG-3') and ASP5 (5'-CCGCTCGAGTCGACCCATGGTCAAAAAGTCATACAAG-AACTTCTC-3'). SP3 and ASP5 contain recognition sites for the restriction endonucleases *Xba*I and *Xho*I, which permit subcloning into the pGEX-KG plasmid for heterologous expression in *E. coli*. DNA amplification was performed under the following conditions: 94 °C for 3 min and four cycles at 94 °C for 30 s, 46 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, followed by 30 cycles as above except that the third step was at 55 °C for 1 min. After the 30 cycles, the reaction mixture was incubated for an additional 10 min at 72 °C. The amplified DNA was resolved by agarose gel electrophoresis, and the band of the correct size (1347 bp) was isolated and subcloned into pCRII-TOPO prior to sequencing.

Heterologous Expression and Purification of HCT

The full-length cDNA generated by reverse transcription-PCR was ligated into the pGEX-KG plasmid, which had been digested with the restriction endonucleases *Xba*I and *Xho*I. The pGEX-KG plasmids containing the HCT gene coding region were electroporated into *E. coli* strain BL21-G612. A 10-ml preculture was grown overnight at 37 °C in LB medium containing 50 mg/liter kanamycin and 100 mg/liter ampicillin. It was used to inoculate 100 ml of fresh medium. Bacteria were grown for 3 h at 37 °C and then transferred to 18 °C overnight after addition of 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside to induce protein expression. After centrifugation for 10 min at 4000 rpm, the bacteria were resuspended in 5 ml of phosphate-buffered saline containing 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1% β -mercaptoethanol, and protease inhibitor mixture tablets (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Cells were lysed by two passages through a French press (Aminco). The bacterial lysate was centrifuged at 11,000 rpm for 30 min; the pellet was discarded; and glutathione-agarose beads (Sigma) were added to the supernatant containing soluble proteins. After 2 h at room temperature, the beads were washed three times with cold phosphate-buffered saline, and the fusion protein was directly cleaved by

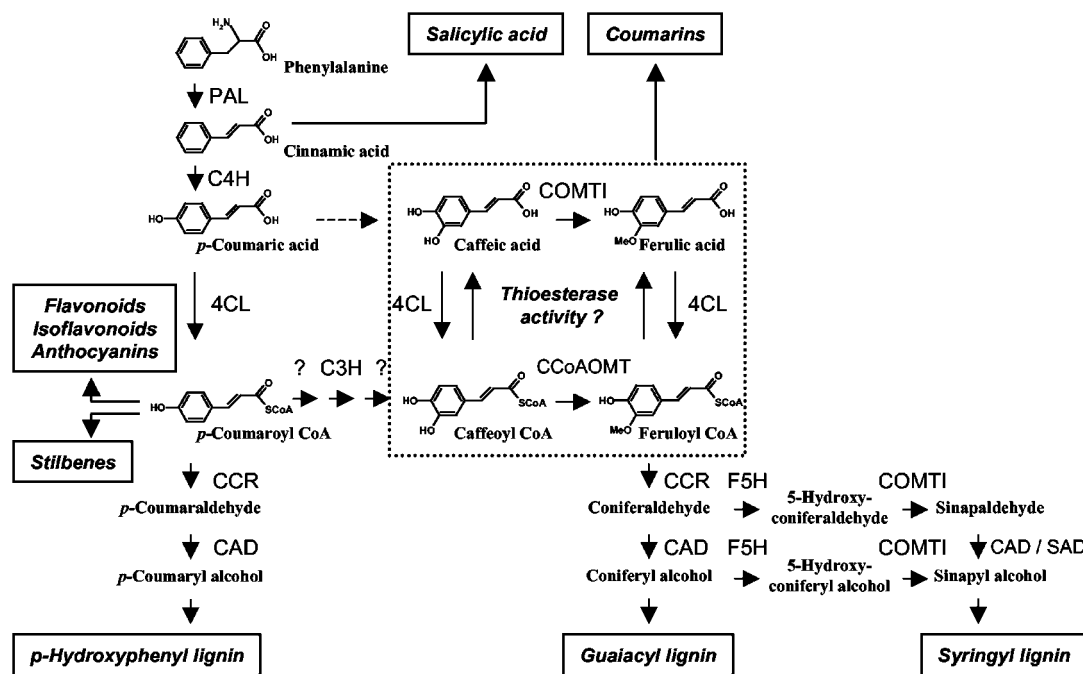


FIG. 1. **Outline of the phenylpropanoid biosynthetic pathway.** Routes to major products are indicated. The *dotted box* includes the reactions that may explain the appearance of ferulic acid after caffeoyl-CoA incubation with tobacco extract (see “Results”). *4CL*, 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase; *C3H*, *p*-coumarate 3-hydroxylase; *C4H*, cinnamate 4-hydroxylase; *CAD*, cinnamyl-alcohol dehydrogenase; *CCoAOMT*, caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase; *CCR*, cinnamoyl-CoA reductase; *COMTI*, caffeic/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase I; *F5H*, ferulate 5-hydroxylase; *PAL*, phenylalanine ammonia-lyase; *SAD*, sinapyl-alcohol dehydrogenase.

incubation of the beads with thrombin for 1 h at room temperature. The supernatant contained the recombinant HCT protein. The different steps of purification were assessed by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gel. The amount of recombinant HCT protein was quantified by densitometry of the bands on polyacrylamide gels stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka) and by the method of Bradford (22) using the Bio-Rad reagent.

Synthesis and Purification of Substrates

CoA esters were prepared according to the method of Stöckigt and Zenk (27) with some modifications (23) and identified and quantified by spectroscopy as described (24).

Enzyme Activity Measurements

Spectrophotometric Assay—During enzyme purification from plant extracts, 10 nmol of *p*-coumaroyl-CoA was added to 100 μ l of protein mixture and incubated at 30 °C for 1 h. The activity was determined by the decrease in the absorbance at 346 nm measured against a blank reaction mixture containing a boiled protein extract.

Standard Assay Conditions for the Recombinant Enzyme—The reaction mixture contained (in a total volume of 20 μ l) 100 mM phosphate buffer (pH 6.6), 1 mM dithiothreitol, 20 ng to 1 μ g of purified enzyme, and the different substrates at 10 μ M to 10 mM. The reaction was initiated by enzyme addition, incubated at 30 °C for 20 min, and terminated by addition of 20 μ l of HPLC solvent. Reaction products were analyzed by HPLC.

Determination of Kinetic Parameters—For K_m determination, varying substrate and enzyme concentrations were used depending on the substrate tested. For K_m with quinate, 50 ng/ μ l purified enzyme, 1 mM *p*-coumaroyl-CoA, and 1–10 mM quinate were used. For K_m with shikimate, 1 ng/ μ l purified enzyme, 1 mM *p*-coumaroyl-CoA, and 250–4000 μ M shikimate were used. For *p*-coumaroyl-CoA K_m measurement, we used 5 ng/ μ l purified enzyme with quinate as acceptor and 1.8 ng/ μ l with shikimate as acceptor, 4 mM quinate or shikimate, and 10–100 μ M *p*-coumaroyl-CoA. For caffeoyl-CoA affinity determination, 20 or 1 ng/ μ l purified enzyme with quinate or shikimate as acceptor, respectively; 4 mM quinate or shikimate; and 20–500 μ M caffeoyl-CoA were tested. Finally, for feruloyl-CoA K_m measurement, 8 ng/ μ l purified enzyme, 4 mM shikimate, and 20–200 μ M feruloyl-CoA were used. K_m and V_{max} values were calculated from the Lineweaver-Burk plots.

Assay Conditions with Other Putative Acyl Donors or Acceptors—Cinnamoyl-CoA, sinapoyl-CoA, and benzoyl-CoA were tested as acyl donors at a concentration of 100 μ M each in the presence of 50 ng/ μ l

purified enzyme and 4 mM quinate or shikimate. Anthranilate, glucose, malate, tyramine, spermidine, spermine, putrescine, and agmatine were tested as possible acyl acceptors at a concentration of 4 mM each in the presence of 50 ng/ μ l purified enzyme and 4 mM *p*-coumaroyl-CoA.

Assay for Caffeoyl-CoA Synthesis from Chlorogenate—10 ng/ μ l purified enzyme was incubated in the presence of 100 μ M chlorogenate and 100 μ M CoA.

Identification of Reaction Products by HPLC

Incubation mixtures were diluted with 1 volume of 0.1% formic acid and 5% acetonitrile in water and resolved on a Waters reverse-phase C_{18} column (Novapak, 4 μ m, 4.6 \times 250 mm) using an increasing gradient of acetonitrile (5–50%) in water containing 0.1% formic acid. For the characterization of caffeoyl-CoA formed after incubation of HCT in the presence of chlorogenate and CoA, 20 mM phosphate (pH 5.3) was dissolved in water, and a 5–25% acetonitrile gradient was applied for column elution. Reaction products were characterized by their elution time, and their UV absorption spectra were recorded with a Waters photodiode array detector.

3-*O*- and 4-*O*-caffeoylquinic acids were produced from chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic acid; Fluka) by heating for 30 min at 90 °C in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) (25). The isomers were separated by HPLC and collected.

Sequence Alignment

Sequence alignment and analysis were performed with ClustalW software. The phylogenetic tree was built using the TreeView program.

RESULTS

Occurrence of an Activity Degrading Caffeoyl-CoA in Tobacco Stems—As shown in Fig. 1, hydroxycinnamoyl-CoA esters are important metabolic intermediates in the phenylpropanoid pathway. We have previously shown that caffeoyl-CoA is methylated by tobacco caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase to yield feruloyl-CoA (10). Surprisingly, when a crude extract from tobacco stems was used as the enzyme preparation, TLC analysis of reaction products revealed the presence of feruloyl-CoA, ferulic acid, and another unknown compound (data not shown). These results suggest that ferulic acid arises from hydrolysis of either feruloyl-CoA or caffeoyl-CoA, followed by the methyla-

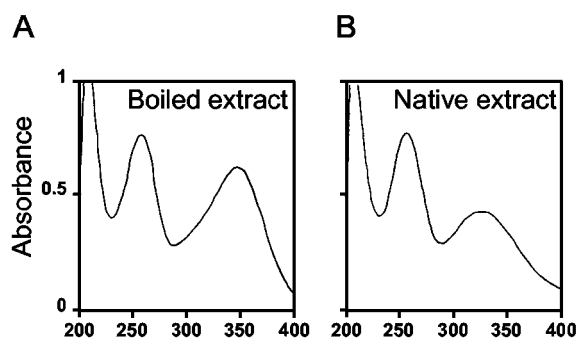


FIG. 2. UV absorbance spectra of caffeoyl-CoA. Absorbance was recorded from 200 to 400 nm after incubation in the presence of boiled (A) or native (B) tobacco stem protein extract.

tion of caffeic acid, which is known to be catalyzed by caffeic/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase I *in vitro* (10, 26). The reactions involved are indicated by the dotted box in Fig. 1.

To discriminate between these two possibilities, we first investigated the stability of hydroxycinnamoyl-CoA esters in the presence of protein extracts from tobacco stems. As shown in Fig. 2A, the UV absorption spectrum of caffeoyl-CoA presents three maxima of absorption. The peak at 346 nm is characteristic of the presence of the thioester bond (27). After a 1-h incubation of caffeoyl-CoA at 30 °C in the presence of tobacco stem extract (Fig. 2B), the absorbance of the two first peaks remained roughly unchanged, whereas the third absorption peak had markedly decreased. These observations indicate that hydrolysis of caffeoyl-CoA is catalyzed by the crude enzyme extract. No change in the absorption spectrum was recorded in the absence of protein extract (data not shown) or in the presence of a boiled protein extract (Fig. 2A).

Purification of Tobacco Thioesterase—The total protein extract from tobacco stems was clarified by centrifugation and filtration. Proteins were first fractionated by anion exchange chromatography under fast protein liquid chromatography conditions (Fig. 3A). Fractions containing thioesterase activity (as measured by the decrease in absorbance at 346 nm) were then pooled, concentrated, and submitted to two successive molecular sieving chromatography steps (Fig. 3, B and C). Table I summarizes the purification factor and yield values measured at each purification step. Likely due to some enzyme instability, a final enzyme activity recovery of 0.6% was observed, resulting in a low apparent purification factor. All our attempts to further purify the enzyme were unsuccessful and led to a complete loss of thioesterase activity. However, when the content of active protein fractions from the second molecular sieving step was analyzed by electrophoresis on SDS gels, only a limited number of protein species were detected (Fig. 3D). Among the protein bands, those in the 45–51-kDa range displayed intensity variations, which correlated with enzyme activity levels. Therefore, fractions 34–40 were pooled, concentrated, and submitted to preparative SDS gel electrophoresis, followed by blotting on membrane. Every protein band in the 45–51-kDa range was microsequenced, and one amino acid sequence revealed important homology to protein sequences available in the data banks: as shown in Fig. 4, the N-terminal amino acid sequence of a 51-kDa tobacco protein (Fig. 3D, arrow) displayed 12 of 18 residues identical to the N terminus of a carnation protein that has been characterized as a hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase involved in the biosynthesis of dianthramides (18).

Cloning and Purification of the Recombinant Protein—The N-terminal sequence of the HCT protein purified from tobacco and the consensus sequences found in the acyltransferase family (19) were used to design primers for the first step of PCR

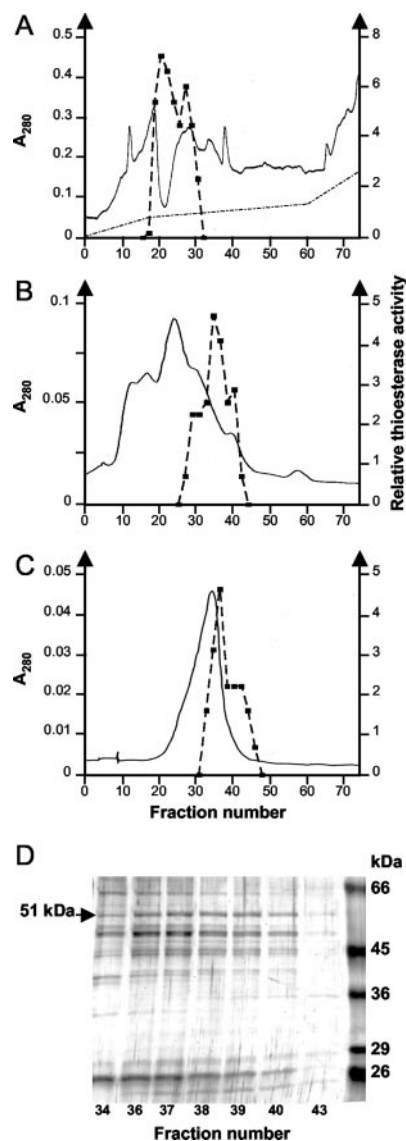


FIG. 3. Purification of tobacco thioesterase by HPLC. Protein elution profiles (solid lines) and thioesterase activity profiles (dashed lines) after ion exchange chromatography (A) and two successive molecular sieving steps (B and C) are shown. Active fractions from the separation shown in C were analyzed by SDS-PAGE, followed by silver staining (D). In D, the arrow indicates the position of the 51-kDa protein that proved to be HCT; protein markers of the given molecular masses appear on the right.

cloning (see “Experimental Procedures”). At the end of the cloning procedure, a nearly full-length tobacco cDNA clone was obtained, the sequence of which is shown in Fig. 5. The closest match found in the data banks (considering only characterized gene products) was still with the anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyl transferase from carnation, which shares 46% identity and 62% similarity with the tobacco protein. Both proteins belong to a multifunctional superfamily of plant acyltransferases (19). Fig. 6 presents a few sequences of typical members of the family, the catalytic properties of which have been well characterized. They catalyze the transfer of acetyl, benzoyl, or hydroxycinnamoyl groups onto a variety of acceptor molecules, including alkaloids (salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase and deacetylindoline 4-*O*-acetyltransferase), anthranilate (anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase), benzyl alcohol (benzyl-alcohol acetyltransferase), anthocyanins (anthocyanin 5-aromatic acyltransferase), and diterpenoids (3'-*N*-debenzoyl-2'-deoxytaxol *N*-benzoyltransferase). As shown in

TABLE I
Summary of the purification of HCT from tobacco stems

Enzyme activity was measured by the decrease in absorbance at 346 nm ($\Delta A_{346\text{ nm}}$), and protein amount was estimated by the Bradford method (22) as described under "Experimental Procedures."

Purification step	Activity	Protein	Specific activity	Total activity	Yield	Purification factor
	$\Delta A_{346\text{ nm}}/\text{h}/\mu\text{l}$	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\Delta A_{346\text{ nm}}/\text{h}/\mu\text{g}$	$\Delta A_{346\text{ nm}}/\text{h}$	%	fold
Crude extract	0.33	0.26	1.25	16.10 ³		
Ion exchange	0.26	0.03	7.5	2.3.10 ³	14	6
1st molecular sieving	0.15	0.015	10	320	2	8
2nd molecular sieving	0.085	0.01	8	100	0.6	6.5



FIG. 4. Alignment of N-terminal sequences of tobacco and carnation proteins. Vertical lines indicate the amino acid residues strictly conserved in the two proteins.

Fig. 6, all these proteins have structural features in common, in particular an HXXXD motif (His¹⁵³-Asp¹⁵⁷) that may function in acyl transfer catalysis and the DFGWG block (Asp³⁸²-Gly³⁸⁶) that was used to design cloning primers (see "Experimental Procedures"). To investigate the potential catalytic activity of the tobacco protein, the cloned cDNA was transformed into *E. coli* bacterial cells, and expression of a GST fusion protein was induced as described under "Experimental Procedures." The fusion protein, present in the soluble fraction of transformed bacteria (Fig. 7, lane 6), was purified by affinity chromatography on glutathione-agarose beads and then cleaved by thrombin, yielding the recombinant protein as illustrated in lane 8. The purified recombinant enzyme was used for substrate specificity studies.

Substrate Specificity of Tobacco HCT—As mentioned above, the importance of an acyltransferase step in the phenylpropanoid biosynthetic pathway has been strongly suggested by the recent characterization of a cytochrome P450 3'-hydroxylase that displays a high level of specificity for depsides versus free coumaric acid (15). Because *p*-coumaroyl quinate and *p*-coumaroyl shikimate were shown to be substrates for the P450 hydroxylase, we investigated the possibility that the tobacco enzyme catalyzes the synthesis of these compounds. Thus, we incubated the purified recombinant enzyme in the presence of *p*-coumaroyl-CoA and quinic acid or shikimic acid and analyzed the reaction products by HPLC (Fig. 8, A and B). HPLC profiles recorded after incubation of substrates with (right panels) or without (left panels) active enzyme preparations are shown. In the presence of active enzyme, a new product was detected in both cases, the absorbance spectrum of which was similar to that of *p*-coumaric acid due to the presence of the *p*-coumaroyl moiety (data not shown). The reaction products were further identified by comparing their retention times with those of authentic quinate and shikimate esters of *p*-coumaric acid (15). *In planta*, these compounds are converted by the P450 hydroxylase into the corresponding caffeoyl esters, which, in turn, must be transformed into caffeoyl-CoA ester, which is the substrate of caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase, the next enzyme in the pathway (Fig. 1). Because plant acyltransferases have been described as having reversible activity (28–31), we investigated whether the tobacco enzyme can also catalyze the reverse reaction, *i.e.* the formation of caffeoyl-CoA from quinate ester. When chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic ester) was incubated in the presence of HCT and CoA (Fig. 8C), it decreased in quantity (reflected by diminished peak height), whereas a small peak of caffeoyl-CoA appeared. The caffeoyl-CoA peak was identified by comparing the elution time and spectroscopic properties with

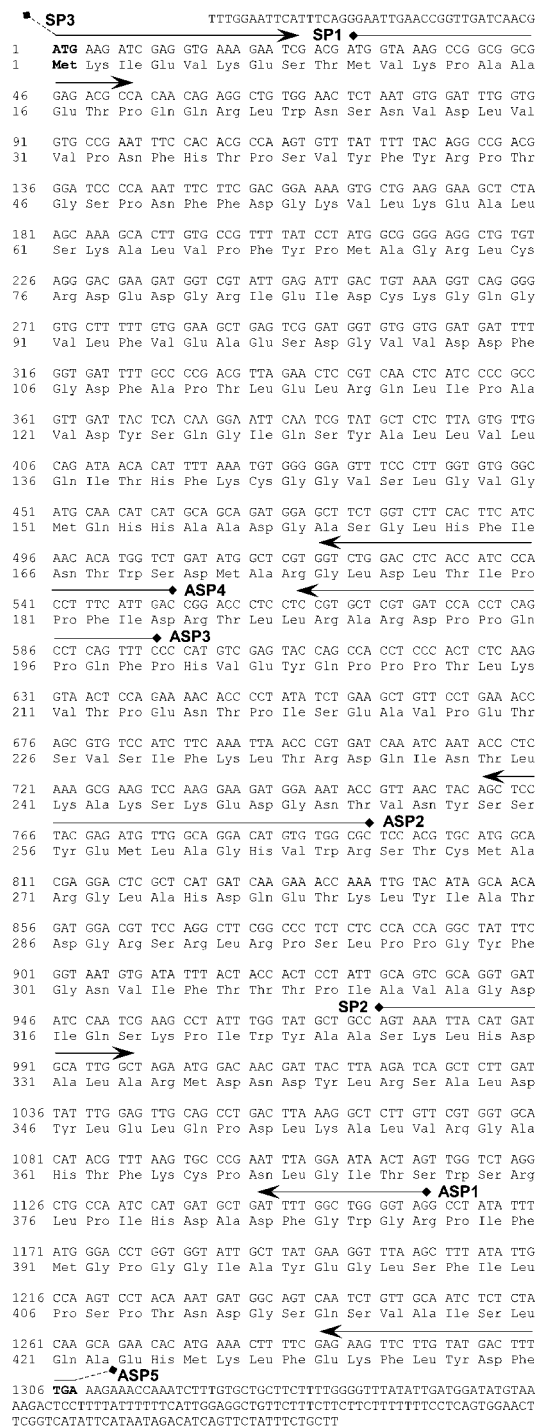


FIG. 5. Nucleotide and deduced amino acid sequences of tobacco HCT cDNA. Initiation and termination codons are in boldface. Arrows indicate the positions of sense (SP1–3) and antisense (ASP1–5) primers used for cloning (see "Experimental Procedures").

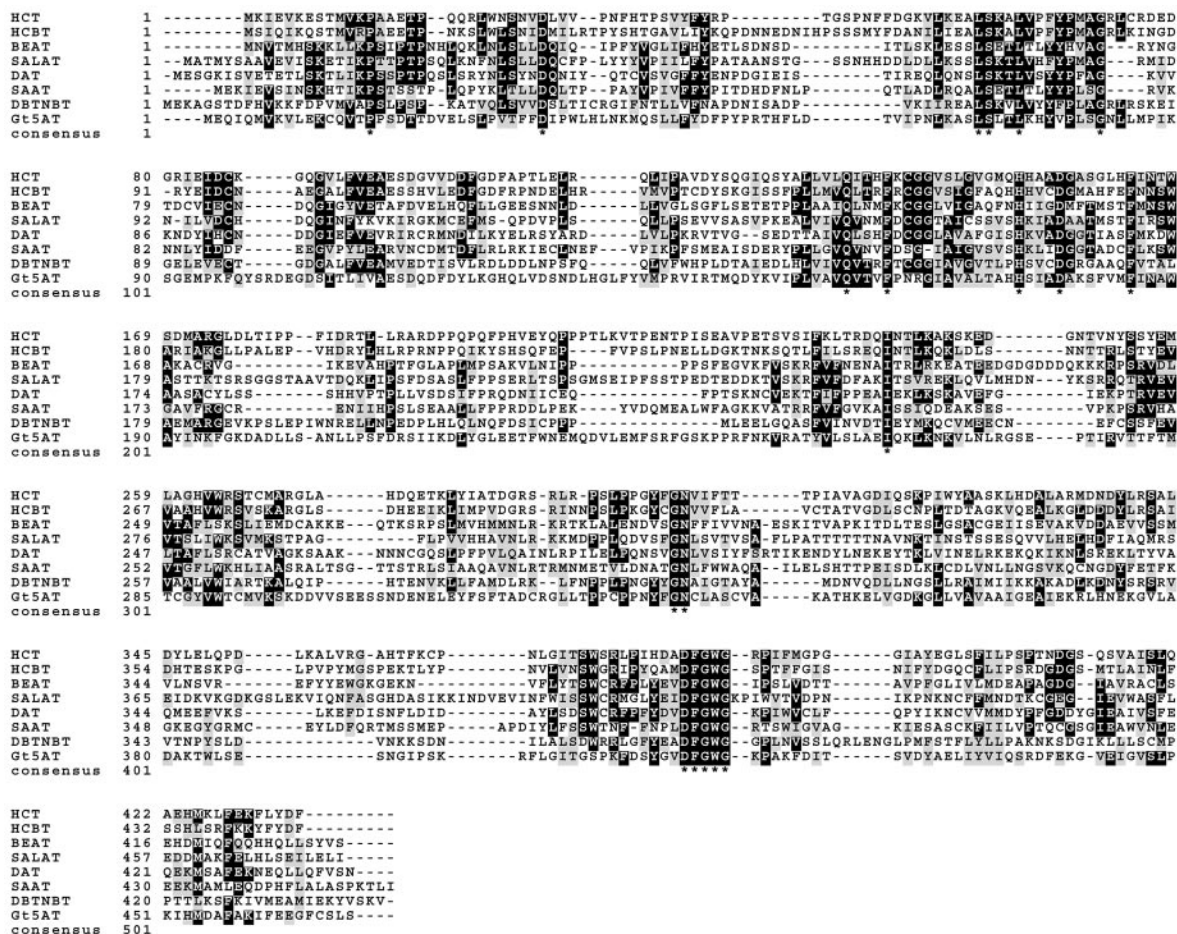


Fig. 6. Sequence alignment of representative members of the plant acyltransferase family. HCT was from *N. tabacum* (this work). HCBT, anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from *Dianthus caryophyllus*; BEAT, benzyl-alcohol acetyltransferase from *Clarkia breweri*; SALAT, salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase from *Papaver somniferum*; DAT, deacetylindoline 4-*O*-acetyltransferase from *Catharanthus roseus*; SAAT, strawberry alcohol acyltransferase from *Fragaria ananassa*; DBTNBT, 3'-*N*-debenzoyl-2'-deoxytaxol *N*-benzoyltransferase from *Taxus cuspidata*; Gt5AT, anthocyanin-5-*O*-glucoside 6'-*O*-acyltransferase from *Gentiana triflora*. Black and gray boxes indicate conserved and similar residues, respectively, in at least four of the eight sequences shown. In the consensus row, asterisks indicate residues conserved in the eight sequences. GenBank™/EBI accession numbers are given in the legend to Fig. 9.

those of an authentic standard. To quantify the reverse HCT reaction, we also used another solvent system allowing the precise estimation of newly formed caffeoyl-CoA ester (see "Experimental Procedures"). These results indicate that transferase activity may be implicated at different levels in the phenylpropanoid metabolic grid.

To gain insight into HCT function, we evaluated the kinetic parameters of the purified enzyme for a range of substrates. As shown in Table II, the affinity of the enzyme for shikimate as acceptor was ~100-fold higher than for quinate. When quinate was tested as the acceptor molecule, *p*-coumaroyl-CoA was a better donor compared with caffeoyl-CoA (Table II), whereas no activity at all was recorded with feruloyl-CoA or sinapoyl-CoA (data not shown).

DISCUSSION

A thioesterase activity hydrolyzing caffeoyl-CoA was detected in tobacco extracts and purified. From the N-terminal

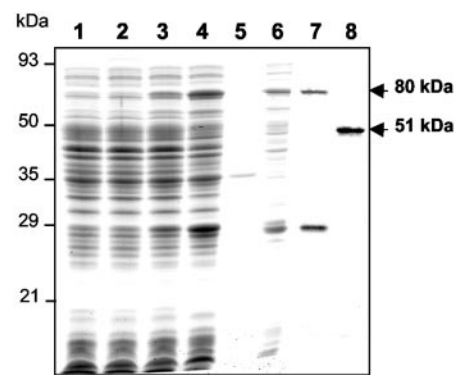


Fig. 7. Purification of the recombinant protein expressed in *E. coli*. Bacterial proteins were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. Protein contents of uninduced (lane 1) and induced (lane 2) non-transformed cells were compared with those of uninduced (lane 3) and induced (lane 4) transformed cells. The GST-HCT fusion protein (80-kDa protein) strongly accumulated after induction of transformed bacteria (lane 4). The fusion protein was not detected in the insoluble fraction (lane 5), but was present in a large amount in the soluble fraction (lane 6). After fixation on glutathione-agarose beads, the fusion protein was either eluted with a glutathione solution (lane 7) or cleaved by thrombin to liberate the purified HCT protein (lane 8). The arrows indicate the positions of the GST-HCT fusion protein (80 kDa) and HCT (51 kDa). The positions of markers of known molecular masses are indicated on the right.

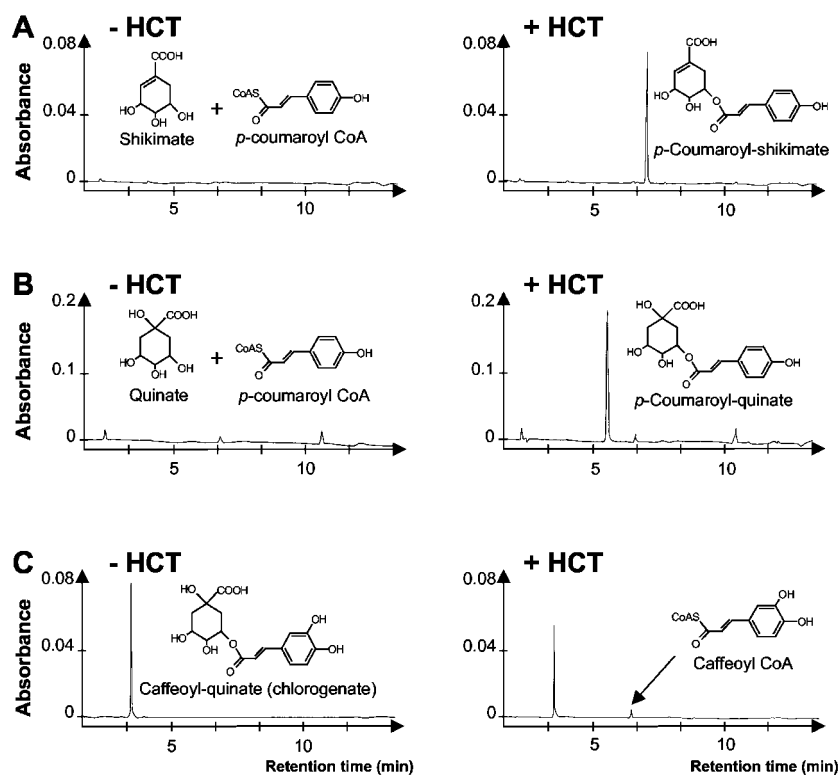


FIG. 8. HPLC analysis of HCT reaction products. An aliquot of the incubation medium without (*left panels*) or with (*right panels*) HCT was analyzed. The nature of the substrates tested is presented in the *left panels*, and that of the reaction products detected at 320 nm in the *right panels*. Products were characterized by their retention times, and UV absorbance spectra were recorded with a photodiode array detector.

TABLE II
Kinetic parameters of recombinant HCT

Concentrations of substrates and assay conditions are detailed under "Experimental Procedures." The K_m and V_{max} values were calculated from triplicates by the Lineweaver-Burk method.

Varying substrate	Saturating substrate (4 mM)	Kinetic parameters		
		K_m μM	V_{max} picokatal/mg	V_{max}/K_m picokatal/mg/ μM
<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	Shikimate	600 ± 150	65 ± 20	0.11
Caffeoyl-CoA	Shikimate	50 ± 20	15 ± 5	0.3
Feruloyl-CoA	Shikimate	350 ± 100	10 ± 5	0.03
<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	Quinate	150 ± 50	4.6 ± 1.6	0.03
Caffeoyl-CoA	Quinate	730 ± 200	1.4 ± 0.35	0.002
Shikimate	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	750 ± 100	140 ± 20	0.19
Quinate	<i>p</i> -Coumaroyl-CoA	70.10 ³ ± 40.10 ³	21 ± 10	0.0003

amino acid sequence of the purified protein, we cloned the corresponding cDNA, which proved homologous to acyltransferase genes from various origins and with diverse functions (Fig. 6). Plant acyltransferases are encoded by a large gene family, the members of which are involved in the biosynthesis of a wide variety of secondary metabolites (18, 19, 32) and display common structural features that enabled us to clone a tobacco homolog. Heterologous expression of the cDNA in *E. coli* yielded a recombinant protein that was purified and characterized. The enzyme was shown to be the most active with *p*-coumaroyl-CoA and caffeoyl-CoA esters as acyl donors, to also use feruloyl-CoA (but less efficiently), and to have very low activity with sinapoyl-CoA. Surprisingly, cinnamoyl-CoA was a good donor (data not shown), but the functionality of the resulting cinnamic esters in the lignin biosynthetic route is not demonstrated because it is not known whether these esters are substrates for cinnamate 4-hydroxylase or *p*-coumarate 3-hydroxylase. It is noteworthy that the tobacco acyltransferase has a pronounced preference for shikimic acid *versus* quinic acid as acceptor (Table II), but can, however, efficiently catalyze the synthesis of quinate esters (Fig. 8). This contrasts with the strict specificity of acyltransferases partially purified from various plants, which have been reported to transfer the acyl

group of CoA esters either to quinate or to shikimate, but not to both (29–31). We have also tested other potential acceptors shown to be active with other plant enzymes, *viz.* anthranilate, glucose, malate, tyramine, spermidine, spermine, putrescine, agmatine, and benzyl alcohol; but no activity could be detected with these compounds (data not shown). Thus, the tobacco enzyme appears to be specialized in the synthesis of quinate and shikimate esters.

HCT belongs to a versatile plant acyltransferase family that shares structural motifs (Fig. 6) and that comprises several members (the catalytic properties of which have been determined) that are involved in diverse secondary metabolisms of plants. We aligned the sequences of all these biochemically characterized acyltransferases and constructed the phylogenetic tree presented in Fig. 9. It appears that the gene sequences from different plant species cluster within four distinct groups. Groups A and B (Fig. 9) include acyltransferases involved in Taxol and anthocyanidin biosynthesis, respectively. Gene products of group C catalyze the esterification of the hydroxyl moiety of metabolically unrelated molecules, whereas subgroup D comprises HCT and the related enzyme anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase, both of which transfer hydroxycinnamoyl groups to acceptors issued from the

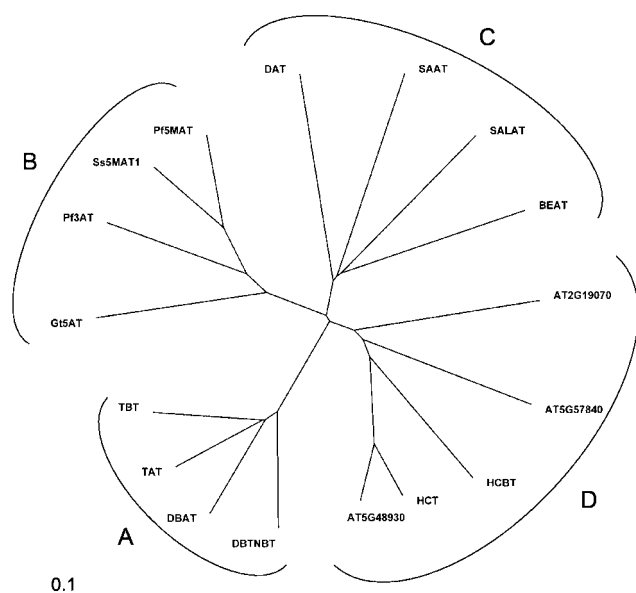


FIG. 9. Phylogenetic tree of acyltransferases revealing four evolutionary sequence clusters. The tree was constructed by neighbor-joining distance analysis. Line lengths indicate the relative distances between nodes. Sequences of biochemically characterized enzymes were used for alignment, *DBTNBT*, 3'-*N*-debenzoyl-2'-deoxytaxol *N*-benzoyltransferase from *T. cuspidata* (GenBank™/EBI accession number AF466397); *DBAT*, deacetylbaaccatin III 10-*O*-acetyltransferase from *T. cuspidata* (accession number AF193765); *TAT*, taxadienol acetyltransferase from *T. cuspidata* (accession number AF190130); *TBT*, taxane benzoyltransferase from *T. cuspidata* (accession number AF297618); *Gt5AT*, anthocyanin-5-*O*-glucoside 6''-*O*-acyltransferase from *G. triflora* (accession number BAA74428); *Pf3AT*, anthocyanin-3-*O*-glucoside 6''-*O*-acyltransferase from *P. frutescens* (accession number BAA93475); *Ss5MaT1*, anthocyanin-5-*O*-glucoside 6'''-*O*-malonyltransferase from *Salvia splendens* (accession number AF405707); *Pf5MAT*, anthocyanin 5-*O*-glucoside-6'''-*O*-malonyltransferase from *Perilla frutescens* (accession number AF405204); *DAT*, deacetylvinoldoline 4-*O*-acetyltransferase from *C. roseus* (accession number AF053307); *SAAT*, strawberry alcohol acyltransferase from *F. ananassa* (accession number AF193789); *SALAT*, salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase from *P. somniferum* (accession number AF339913); *BEAT*, benzyl-alcohol acetyltransferase from *C. breweri* (accession number AF043464); *AT2G19070* and *AT5G57840*, *A. thaliana* genes encoding putative acyltransferases; *HCBT*, anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from *D. caryophyllus* (accession number Z84383); *AT5G48930*, *A. thaliana* gene product with activity similar to that of HCT (L. Hoffmann, S. Besseau, P. Geoffroy, and M. Legrand, unpublished data). HCT is from *N. tabacum* (this work).

shikimate pathway (*viz.* shikimate, quinate, and anthranilate). A survey of the *Arabidopsis* genome has uncovered ~60 genes putatively encoding acyltransferases of the same family.² Among them, three are located in group D, and the closest gene (*AT5G48930*) (Fig. 9) codes for an acyltransferase with biochemical activity similar to that of HCT.³ Thus, phylogenetic analysis of the acyltransferase family defines four evolutionary groups and should provide a useful framework for studying the functions of the numerous members of this plant gene family.

The unsuspected importance of *p*-coumaroylquinic and *p*-coumaroylshikimic esters in phenylpropanoid metabolism was uncovered by characterization of the *Arabidopsis* *p*-coumarate 3-hydroxylase, which very efficiently hydroxylates the two esters, but not *p*-coumaric acid or *p*-coumaroyl-CoA (15). In the present work, we cloned and expressed the acyltransferase situated upstream of the 3-hydroxylation step, which furnishes the substrates to the P450 hydroxylase. We have shown that

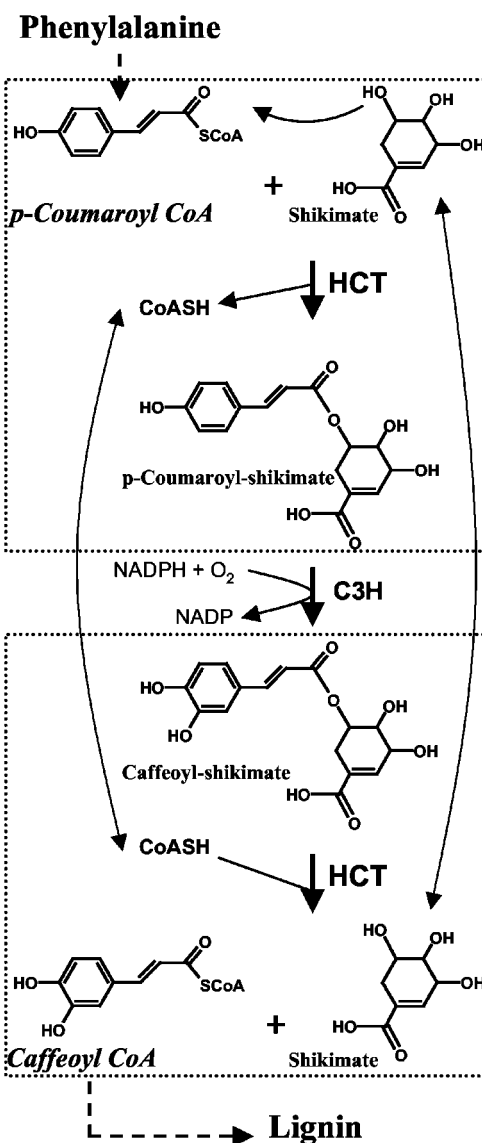


FIG. 10. Scheme of the function of HCT in the phenylpropanoid pathway. The steps catalyzed by HCT are boxed. The double-headed curved arrows illustrate CoASH and shikimate recycling. C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase.

chlorogenic acid (one hydroxylation reaction product), which is the most abundant phenolic compound in tobacco, can yield caffeoyl-CoA when incubated in the presence of CoA and HCT. Thus, HCT plays a dual role in the phenylpropanoid pathway, upstream as well as downstream of the 3-hydroxylation step, as schematically summarized in Fig. 10. Then, caffeoyl-CoA is methylated by caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase to yield feruloyl-CoA, the precursor of guaiacyl and syringyl lignins (see Fig. 1). In fact, although free hydroxycinnamic acids have long been thought to be key intermediates in the pathway, it has now been clearly demonstrated that many enzymatic conversions occur instead at the level of hydroxycinnamic esters, aldehydes, and alcohols (33).

The shikimate pathway provides precursors not only of aromatic amino acids, but also of a vast array of secondary metabolites specific to plants (34). Chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquinic ester) is the most widespread depside in the plant kingdom (7) and is particularly abundant in Asteraceae, Solanaceae, and Rubiaceae (25). In Nicotianaea, its biosynthesis has been studied using radiolabeling methods (35) and cell-free preparations of cell suspensions (36). These studies have shown

² L. Hoffmann, unpublished data.

³ L. Hoffmann, S. Besseau, P. Geoffroy, and M. Legrand, unpublished data.

that 5-*O*-caffeoylquinic ester is the precursor of 3- and 4-isomers. Their biosynthesis has been shown to be affected by environmental cues (7, 37), thus pointing to a regulatory role for the acyltransferase step. Moreover, the recently elucidated major role of quinate and shikimate esters as committed intermediates in the biosynthesis of phenylpropanoids demonstrates that quinate and shikimate have a dual role in plant metabolism, both as precursors of aromatic amino acids as stressed above and as acceptors in acyltransferase reactions. Because acyltransferase efficiency is lower with quinate than with shikimate, regulation of transferase activity may depend on the relative importance of the pools of the two acceptors. In this respect, it is interesting to note that the two compounds are directly convertible in the shikimate pathway (34), thus allowing fine-tuned control of their relative amounts. Compared with the considerable amounts of quinate esters found in some plants, it is striking that shikimate ester accumulation has never been reported (31). This may indicate that small quantities of shikimate are sufficient to permit 3-hydroxylation of the aromatic ring at the level of shikimate ester because the subsequent hydrolysis of the ester into caffeoyl-CoA recycles shikimic acid (Fig. 10). No doubt, future in-depth studies of HCT regulation in various physiological situations will uncover a new checkpoint of the phenylpropanoid flux.

New insights into phenylpropanoid pathway have come recently through antisense repression of several enzymes (4, 5, 33, 38, 39). Such data are now needed to fully understand the function of tobacco HCT *in planta*. Because HCT is likely implicated in the biosynthesis of guaiacyl and syringyl units of lignin, but also in that of caffeoylquinic esters, the predominant soluble phenolic compounds in many plants, one can anticipate that HCT activity changes will have an important impact on plant cell metabolism.

Acknowledgments—We are grateful to Monique Leret for amino acid sequence determination and to Philippe Hamman and Malek Alioua for DNA sequencing. Drs. Kenneth Richards and T. Heitz (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes) are gratefully acknowledged for careful reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Dixon, R. A., and Paiva, N. L. (1995) *Plant Cell* **7**, 1085–1097
2. Douglas, C. J. (1996) *Trends Plant Sci.* **1**, 171–178
3. Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1989) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*

- 40**, 347–369
4. Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., and Boerjan, W. (1998) *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 125–197
5. Boudet, A. M., Lapiere, C., and Grima-Pettenati, J. (1995) *New Phytol.* **129**, 203–236
6. Petersen, M., Strack, D., and Matern, U. (1999) *Annu. Plant Rev.* **2**, 151–221
7. Zenk, M. H. (1979) *Recent Adv. Phytochem.* **12**, 139–176
8. Allina, S. M., Pri-Hadash, A., Theilmann, D. A., Ellis, B. E., and Douglas, C. J. (1998) *Plant Physiol.* **116**, 743–754
9. Lee, D., and Douglas, C. J. (1996) *Plant Physiol.* **112**, 193–205
10. Maury, S., Geoffroy, P., and Legrand, M. (1999) *Plant Physiol.* **121**, 215–224
11. Ye, Z.-H., Kneusel, R. E., Matern, U., and Varner, J. E. (1994) *Plant Cell* **6**, 1427–1439
12. Humphreys, J. M., Hemm, M. R., and Chapple, C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10045–10050
13. Osakabe, K., Tsao, C. C., Li, L., Popko, J. L., Umezawa, T., Carraway, D. T., Smeltzer, R. H., Joshi, C. P., and Chiang, V. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8955–8960
14. Chen, F., Yasuda, S., and Fukushima, F. (1999) *Planta* **207**, 597–603
15. Schoch, G., Goepfer, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., and Werck-Reichhart. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 36566–36574
16. Franke, R., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Humphreys, J. M., and Chapple, C. (2002) *Plant J.* **30**, 47–59
17. Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., and Chapple, C. (2002) *Plant J.* **30**, 33–45
18. Yang, Q., Rheiherd, K., Schlitz, E., and Matern, U. (1997) *Plant Mol. Biol.* **35**, 777–789
19. St. Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A., and De Luca, V. (1998) *Plant J.* **14**, 703–713
20. Martz, F., Maury, S., Pinçon, G., and Legrand, M. (1998) *Plant Mol. Biol.* **36**, 427–437
21. Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., and Fritig, B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6750–6754
22. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
23. Negrel, J., and Smith, T. A. (1984) *Phytochemistry* **23**, 31–34
24. Lüderitz, T., Shatz, G., and Grisebach, H. (1982) *Eur. J. Biochem.* **123**, 583–586
25. Strack, D., and Gross, W. (1990) *Plant Physiol.* **92**, 41–47
26. Legrand, M., Fritig, B., and Hirth, L. (1978) *Planta* **144**, 101–108
27. Stöckigt, J., and Zenk, M. H. (1975) *Z. Naturforsch. Sect. C Biosci.* **30**, 352–358
28. Rhodes, M., and Wooldorton, L. (1976) *Phytochemistry* **15**, 947–951
29. Rhodes, M., Wooldorton, L., and Lourenço, E. (1979) *Phytochemistry* **18**, 1125–1129
30. Ulbrich, B., and Zenk, M. (1979) *Phytochemistry* **18**, 929–933
31. Ulbrich, B., and Zenk, M. (1980) *Phytochemistry* **19**, 1625–1629
32. Walker, K., Long, R., and Crotreau, R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9166–9171
33. Humphreys, J. M., and Chapple, C. (2002) *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 224–229
34. Herrmann, K. M. (1995) *Plant Cell* **7**, 907–919
35. Legrand, M., Fritig, B., and Hirth, L. (1971) *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D* **273**, 525–528
36. Stöckigt, J., and Zenk, H. (1974) *FEBS Lett.* **42**, 131–134
37. Fritig, B., Legrand, M., and Hirth, L. (1972) *Virology* **47**, 845–848
38. Pinçon, G., Maury, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapiere, C., Pollet, B., and Legrand, M. (2001) *Phytochemistry* **57**, 1167–1176
39. Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Thollier, M. T., Monties, B., Fritig, B., and Legrand, M. (1995) *Plant J.* **8**, 465–477

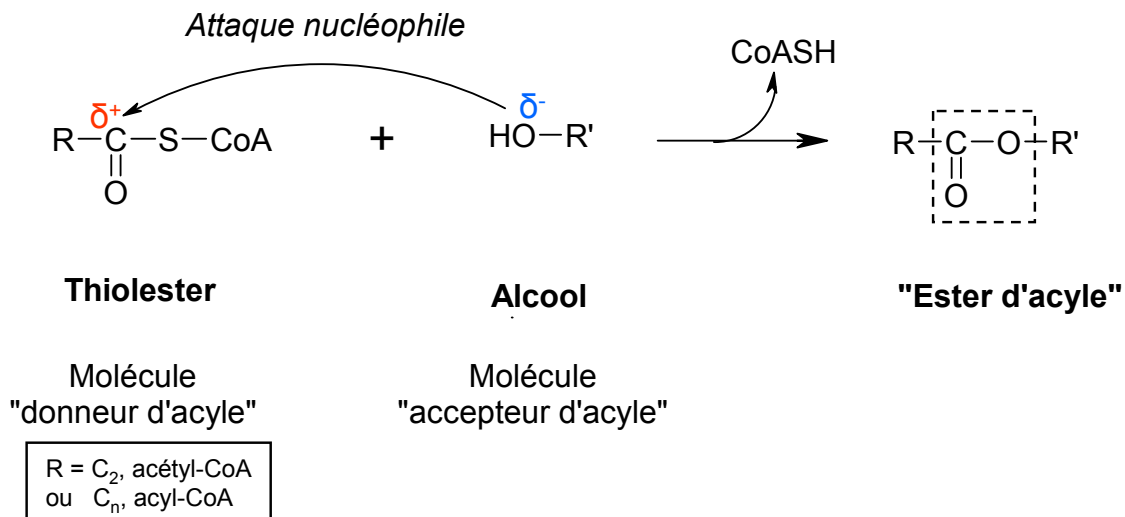


Figure I 10. Exemple de réaction de trans-estérification entre une molécule « donneur d'acyle » (thiolester) et une molécule « accepteur d'acyle » (alcool) pour conduire à un ester. Dans cet exemple, le groupement acyle est transféré sur un atome d'oxygène.

—: liaison ester

3. Compléments d'information sur la superfamille « BAHD » des acyltransférases dépendantes des esters de CoA.

3.1 Introduction

L'acylation enzymatique est une réaction de substitution répandue dans le règne animal (dans la biosynthèse des acides gras par exemple), mais encore plus chez les plantes puisqu'elle conduit à une diversification importante des substances naturelles synthétisées par le métabolisme secondaire des végétaux. Il s'agit d'une réaction de transfert d'un groupement acyle (C_n = acyle; C_2 = acétyle) apporté par une molécule appelée « donneur d'acyle », sur une molécule dite « accepteur d'acyle ». Chimiquement, l'acylation correspond à une attaque nucléophile d'un atome riche en électrons porté par l'accepteur sur une liaison riche en énergie apportée par le donneur d'acyle; on dit que le donneur d'acyle est « activé ». Cette attaque peut conduire, par exemple, à une réaction de trans-estérification et à l'obtention d'un dérivé de la molécule acceptrice encore appelé « ester d'acyle » (**Fig. I 10**).

Le transfert du groupement acyle sur l'accepteur se fait essentiellement soit sur un atome d'oxygène (anthocyanes, taxol) soit sur un atome d'azote (dianthramide, alcaloïdes). La nature de cet atome constitue un premier critère de classification. Mais le nombre de classes des acyltransférases augmente lorsqu'on considère le type de molécules « donneur d'acyle activé ». Chez les plantes, les acyltransférases utilisent 4 groupes principaux de « donneur d'acyle activé » :

- les 1-*O*-acylglucosides impliqués par exemple dans la synthèse du sinapoylmalate (Lehfeldt *et al.*, 2000) et des tannins hydrolysables (Niemetz et Gross, 2001).
- les protéines de type « acetylated-acyl carrier protein » intervenant dans la biosynthèse des acides gras (Cassagne *et al.*, 1994).
- les esters d'acide quinique et shikimique tels que le caféoyl-quinat (CGA) (Villegas *et al.*, 1987 ; Strack et Gross, 1990; article 1)
- et enfin les acyles CoA (**Fig. I 10**; **Fig. 58**), les donneurs d'acyles majoritaires des acyltransférases (St-Pierre et De Luca, 2000).

3.2 Les acyltransférases dépendantes des « esters de CoA activés »

Les réactions catalysées par cette classe d'acyltransférases sont impliquées dans la biosynthèse de nombreux composés dérivant aussi bien du métabolisme primaire tels que l'acétyl-CoA (cycle de Krebs), les acides aminés (cystéine) ou encore des acides gras et des lipides, que du métabolisme secondaire, tels que la subérine, les anthocyanes ou encore les alcaloïdes. Chez les animaux, les réactions d'acylation dépendant des esters de CoA jouent un rôle important dans la biosynthèse des neurotransmetteurs de type acétylcholine (Wu et

Hersh, 1994), dans la régulation de la transcription des gènes par acétylation des protéines histones (Kuo et Allis, 1998) ou encore dans la détoxification d'agents cancérigènes (Hein *et al.*, 1992). Chez les procaryotes, ce type d'acyltransférase joue un rôle clef dans la détoxification des antibiotiques tels que le chloramphénicol (Murray et Shaw, 1997). Chez les plantes, ces acyltransférases ont un rôle important dans l'acylation de nombreuses molécules de petit poids moléculaire. Ces réactions d'acylation contribuent à la diversité des métabolites secondaires découverts dans le règne végétal.

Les acyltransférases, végétales ou animales, dépendantes des esters de CoA, sont elles-mêmes très diverses par leur poids moléculaire, leur structure oligomérique ou encore leur séquence primaire. De plus, les études cristallographiques réalisées sur les protéines animales ont indiqué une diversité importante des domaines de fixation et de reconnaissance de la chaîne latérale de CoA (Engel et Wierenga, 1996).

Je vais à présent décrire une superfamille d'acyltransférases particulière, dépendante des esters de CoA, caractérisée récemment (St-Pierre et De Luca, 2000) et dont les membres appartiennent uniquement au règne végétal supérieur et à la classe des champignons.

3.3 La superfamille « BAHD » des acyltransférases dépendantes des esters de CoA

Chez les plantes, la majorité des acyltransférases dépendantes des esters de CoA sont monomériques et possèdent une masse molaire avoisinant les 50 kDa. Ces critères structuraux constituent la première caractéristique commune des enzymes appartenant à la superfamille « BAHD ». Ces enzymes catalysent le transfert de groupements acyles sur des molécules majoritairement associées avec les voies métaboliques secondaires. Le groupement transféré sur l'accepteur est de nature variable. Il peut s'agir par exemple d'un groupement acétyle, malonyl, benzoyl ou encore hydroxycinnamoyl.

En dehors de leur similarité de structure, ces enzymes possèdent des similarités de séquence, avec la conservation de certains acides aminés caractéristiques dont des résidus histidines, qui semblent jouer une fonction primordiale dans l'activité catalytique (St-Pierre *et al.*, 1998).

Ces six dernières années, plusieurs gènes codant pour des acyltransférases monomériques (de 45 à 61 kDa) ont été isolés chez plusieurs espèces végétales et chez des champignons eucaryotiques (St-Pierre et De Luca, 2000). Les premiers gènes à avoir été caractérisés codent pour deux acétyltransférases et deux hydroxycinnamoyltransférases, les quatre enzymes étant associées au métabolisme secondaire des plantes. La première acétyltransférase, la DAT pour Deacetylvindoline 4-*O*-acétyltransférase (St-Pierre *et al.*, 1998), est impliquée dans la dernière étape de la biosynthèse de la vindoline chez la pervenche de Madagascar (**Fig. I 11**, au verso). Le second gène code également pour une acétyltransférase impliquée dans la synthèse du benzyl-acétate, un composant majeur des

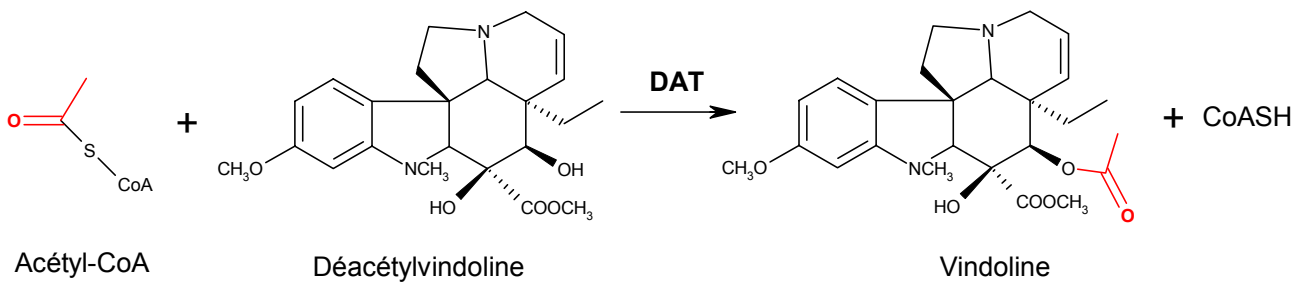


Figure I 11. Réaction d'acylation catalysée par la déacétylvindoline-4-O-acétyltransférase (DAT) impliquée dans la biosynthèse de la vindoline chez *Catharanthus roseus*. (St-Pierre *et al.*, 1998).

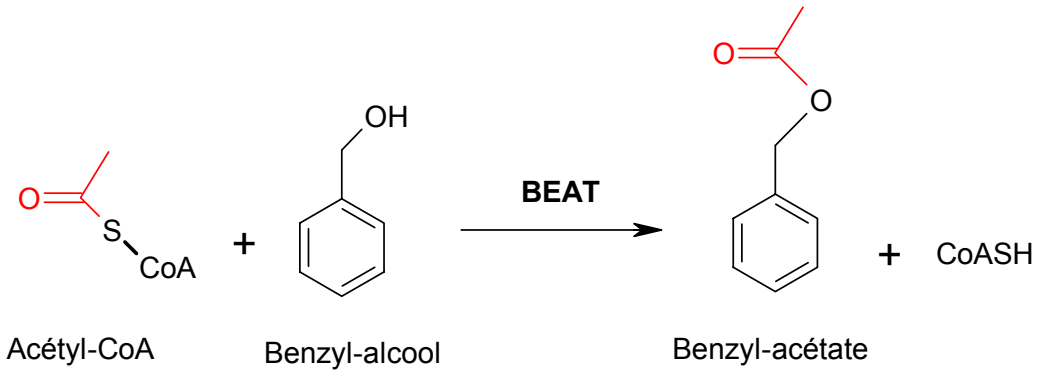


Figure I 12. Réaction d'acylation catalysée par l'acétyl-CoA: benzylalcool acétyltransférase (BEAT) de *Clarkia breweri*. Le produit de la réaction, le benzyl-acétate est à l'origine des senteurs libérées par les fleurs (Dudareva *et al.*, 1998).

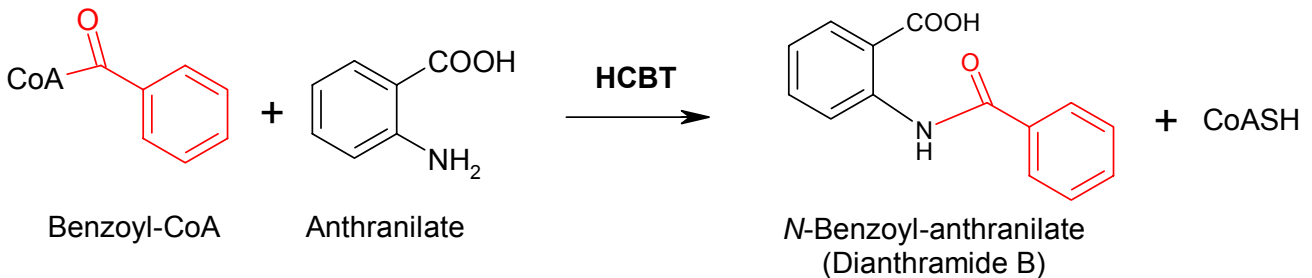


Figure I 13. Réaction d'acylation catalysée par l'anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase (HCBT) de *Dianthus carophyllus*. Le produit de la réaction, la Dianthramide, est une phytoalexine spécifique de l'œillet (Yang *et al.*, 1997).

L'ensemble de ces enzymes définit une classe de protéines responsables du transfert de groupement acyle et ceci de manière CoA dépendante; il s'agit de la superfamille « BAHD ».

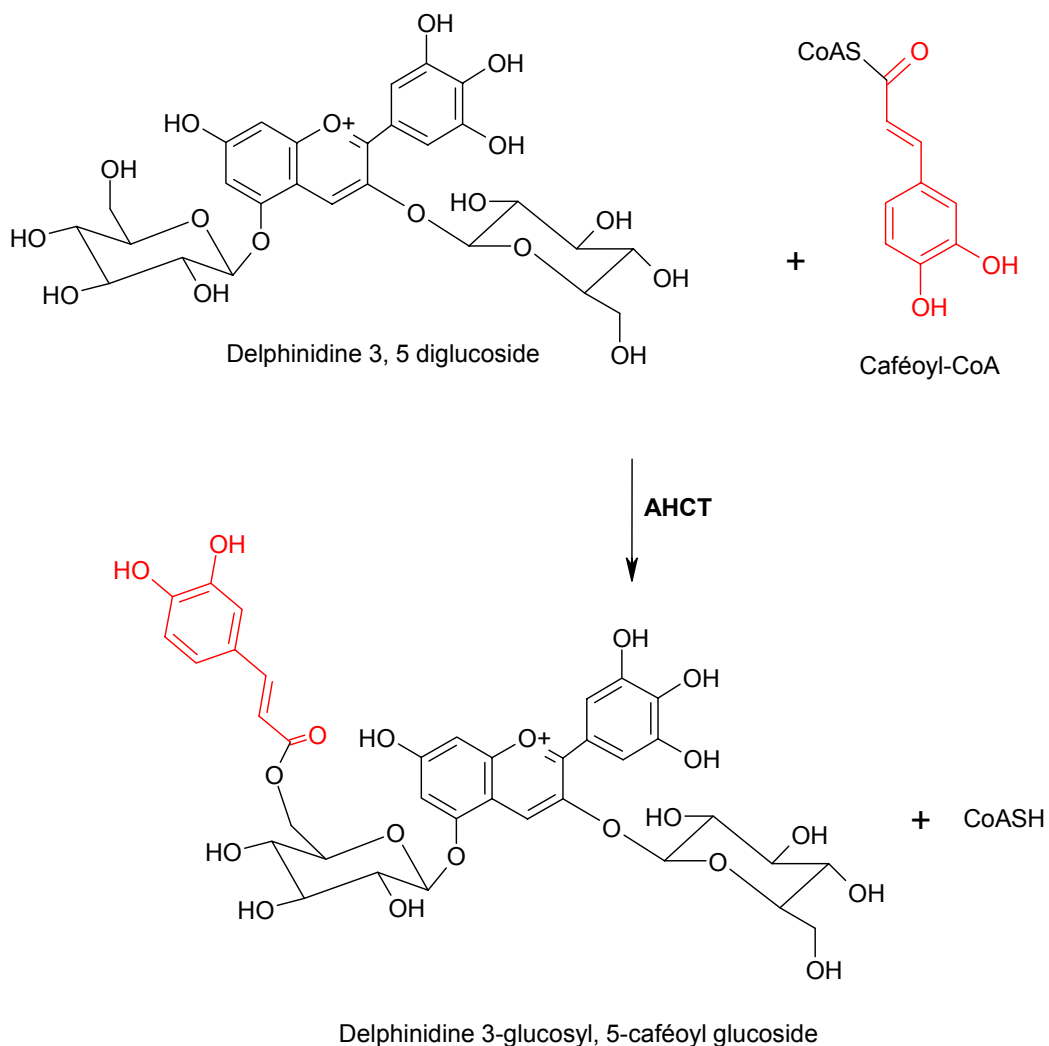
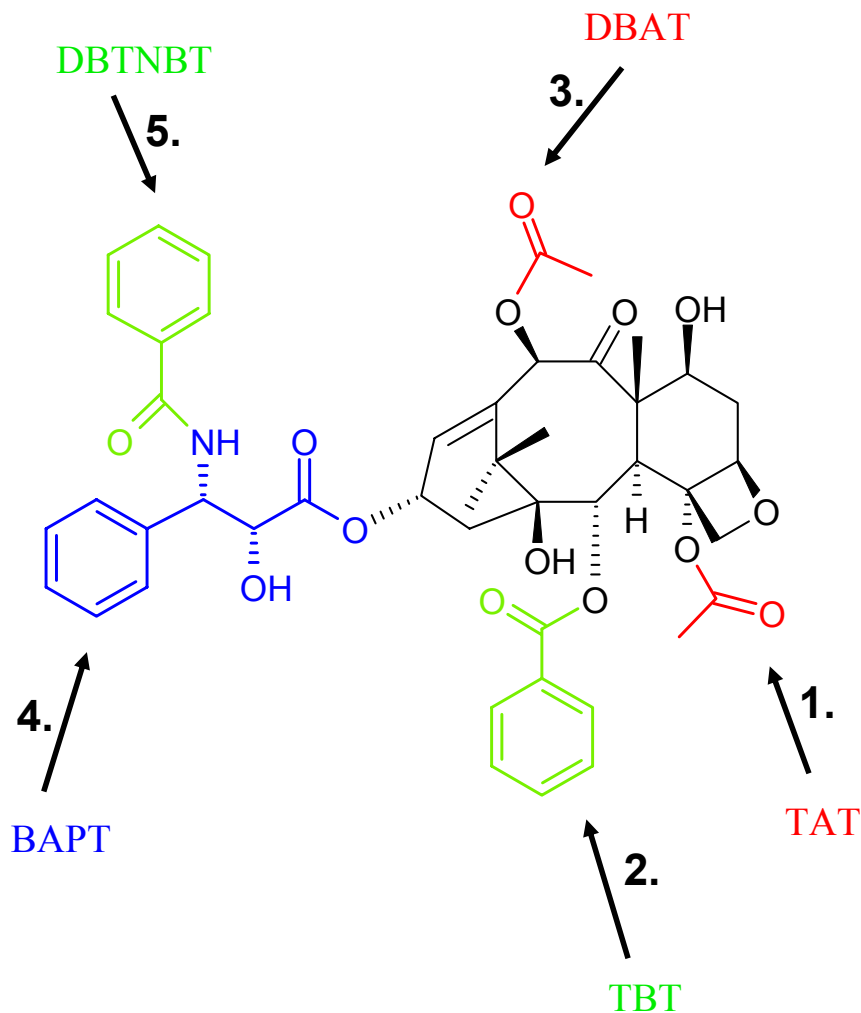


Figure I 14. Réaction d'acylation catalysée par une Anthocyanine Hydroxycinnamoyl-transférase (AHCT) de *Gentiana triflora*, une anthocyanine 5-aromatic acyltransférase (Fujiwara *et al.*, 1998).



Taxol (*Taxus*)

Figure I 15. Le taxol, une molécule anticancéreuse, fait partie des molécules les plus complexes appartenant à la famille des diterpènes. **Sa biosynthèse nécessite 5 réactions d'acylation** catalysées par 5 acyltransférases différentes appartenant à la superfamille « BAHD ». L'ordre chronologique de l'addition des groupements acyles est indiqué par les numéros. **1.** TAT, acétyl-CoA:taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol-O-acétyltransférase (Walker *et al.*, 2000); **2.** TBT, taxane 2- α -O-benzoyltransférase (Walker et Croteau, 2000b); **3.** DBAT, 10-déacétylbaccatin III-10-O-acétyltransférase (Walker et Croteau, 2000a); **4.** BAPT, Baccatin III:3-amino-3-phénylpropanoyltransférase (Walker *et al.*, 2002b); **5.** DBTNBT, 3' -N-débenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransférase (Walker *et al.*, 2002a).

essences florales des espèces végétales *Clarkia breweri*, la BEAT pour Benzylalcohol *O*-acétyltransférase (Dudareva *et al.*, 1998) (**Fig. I 12**). Le troisième gène code pour l'HCBT, pour Anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase (Yang *et al.*, 1997), impliquée dans la formation de dianthramide, une phytoalexine caractéristique de l'espèce végétale *Dianthus caryophyllus* (**Fig. I 13**). Cette enzyme, comme l'HCT de tabac (article 1) et la plupart des acyltransférases caractérisées transférant un groupement aromatique, présente une spécificité de substrat large pour le donneur d'acyle. L'AHCT, pour Anthocyanin *O*-hydroxycinnamoyltransférase (Fujiwara *et al.*, 1998), codée par le quatrième gène, catalyse la réaction d'acylation sur l'atome d'oxygène d'une des deux molécules de glucose estérifiées sur la delphinidine 3,5-diglucoside (**Fig. I 14**). Ce gène a été isolé chez cinq espèces végétales différentes (*Petunia hybrida*, *Senecio cruentus*, *Gentiana triflora*, *Perilla ocimoides* et *Lavandula angustifolia*). Tous ces gènes possèdent une similarité de séquence faible mais significative (25-26%) avec le gène DAT. Un alignement multiple de toutes ces protéines a permis d'identifier plusieurs régions conservées, suggérant une co-évolution de ce groupe d'enzymes (St-Pierre et De Luca, 2000; article 1). Ainsi, St-Pierre et De Luca ont proposé de définir une nouvelle superfamille d'acyltransférases nommée « BAHD », basée sur le nom de ces 4 premiers membres isolés d'espèces végétales que je viens de présenter (BEAT, AHCT, HCBT et DAT). Deux domaines très conservés sont caractéristiques de cette famille, à savoir le motif **His-X-X-X-Asp** présent dans le site catalytique et le motif **Asp-Phe-Gly-Trp-Gly** dont la fonction reste inconnue (St-Pierre et De Luca, 2000). Depuis, de nombreuses autres acyltransférases présentant les caractéristiques structurales et biochimiques de la superfamille « BAHD » ont été étudiées et isolées chez les plantes, dont l'HCT de tabac (Suzuki *et al.*, 2001; Grothe *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2002b; D'Auria *et al.*, 2002; Shalit *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003; article 1). Il a notamment été caractérisé, en l'espace de trois ans, les 5 acyltransférases impliquées dans la biosynthèse du taxol (**Fig. I 15**) (Walker *et al.*, 2000; Walker et Croteau, 2000a; Walker et Croteau, 2000b; Walker *et al.*, 2002a; Walker *et al.*, 2002b).

Hormis l'isolement de gènes chez les plantes supérieures, seules 3 acyltransférases isolées chez des champignons eucaryotiques présentent une similarité de séquence significative avec des membres de cette famille (Kimura *et al.*, 1998). Ces enzymes possèdent une masse molaire comprise entre 50 à 61 kDa, valeur entrant dans la fourchette des acyltransférases de plantes. Elles présentent une faible similarité de séquence avec la DAT (de 17 à 20%) mais elles ont conservé le motif caractéristique **His-X-X-X-Asp**.

PARTIE II.

La répression du gène *HCT*, grâce à l'infection par un virus recombinant (approche de « Virus Induced Gene Silencing », VIGS), affecte le métabolisme des phénylpropanoïdes et modifie les processus de lignification des tissus conducteurs.

PARTIE II.

La répression du gène *HCT*, grâce à l'infection par un virus recombinant (approche de « Virus Induced Gene Silencing », VIGS), affecte le métabolisme des phénylpropanoïdes et modifie les processus de lignification des tissus conducteurs.

1. Introduction	78
2. Article 2	80
3. Résultats complémentaires	102
3.1 Clonage d'un fragment d'ADNc du gène codant pour HCT chez <i>N. benthamiana</i>	102
3.2 Analyse histologique des tissus conducteurs de plants de <i>N. benthamiana</i> dont le gène <i>HCT</i> est réprimé	102
3.3 Analyse par CLHP de la teneur en composés phénoliques solubles de tige et de feuilles de plants de <i>N. benthamiana</i> dont le gène <i>HCT</i> est réprimé	103
3.4 L'enzyme HCT peut-elle jouer un rôle dans les mécanismes de résistance des plantes aux agents pathogènes? Mesure de l'activité HCT lors de la réaction d'hypersensibilité (RH) du tabac vis-à-vis du VMT	106

PARTIE II : La répression du gène *HCT*, grâce à l'infection par un virus recombinant (approche « Virus Induced Gene Silencing », VIGS), affecte le métabolisme des phénylpropanoïdes et modifie les processus de lignification des tissus conducteurs.

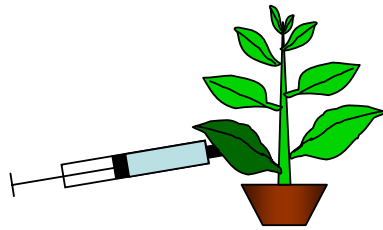
1. Introduction

La capacité d'HCT de synthétiser, *in vitro*, les substrats de la C3H et également de fournir la forme métaboliquement active, le caféoyl-CoA, à partir des esters shikimique et quinique correspondants, laisse supposer un rôle clef de cette enzyme dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (article 1).

La caractérisation génétique et biologique de la C3H est récente. Les travaux de deux groupes de recherche ont abouti pratiquement de façon simultanée à la mise en évidence de sa fonction biologique (Schoch *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2002 a, b). D'un côté, une approche bioinformatique, a permis de postuler pour un gène candidat responsable de cette activité (Schoch *et al.*, 2001). L'immuno-détection de la protéine sur des coupes transversales d'hampe florale et de racine d'*Arabidopsis* a permis de localiser l'enzyme au niveau des tissus conducteurs, à savoir les vaisseaux du phloème et du xylème (**Fig. 24**). Cette observation appuyait l'idée d'une implication de l'enzyme dans la voie de biosynthèse de la lignine. D'un autre côté, les travaux de Franke et Coll. (2002a, b) ont permis de confirmer le rôle de cette enzyme dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. En effet, un mutant d'*Arabidopsis* affecté dans l'expression du même gène que celui étudié par Schoch et Coll. (2001) a pu être isolé. Ces plantes présentaient un net retard de croissance et une modification importante de la composition en composés phénoliques avec notamment l'incorporation de nouvelles unités monomériques non méthoxylées (H) dans la lignine (**Fig. 49**).

Ainsi, la capacité d'HCT à synthétiser les substrats de la C3H suggère que cette nouvelle acyltransférase, que nous venons de caractériser, pouvait constituer le chaînon manquant entre le *p*-coumaroyl-CoA et le caféoyl-CoA. On démontre ci-dessous (article 2) la fonction biologique de l'enzyme HCT, en tant que point de passage obligé dans le métabolisme des phénylpropanoïdes pour conduire à la biosynthèse de la lignine.

Tout d'abord, on a étudié le niveau d'expression du gène *HCT* chez *N. tabacum* par immunodétection de la protéine dans différents tissus. L'accumulation de la protéine est élevée au niveau de la tige, ainsi qu'au niveau des racines et des pétioles, où la quantité mesurée est néanmoins plus faible que dans la tige. A l'inverse, dans les organes floraux le niveau d'expression est très faible, et dans les feuilles la quantité de protéine est trop faible pour être détectée par cette technique. La mise au point d'un test d'activité enzymatique *in vitro* sur des extraits bruts nous a permis de confirmer ces données, suggérant que le niveau



**Infiltration d'une feuille entière de
*N. benthamiana***
avec les différentes constructions
nécessaires pour induire la répression
de l'expression du gène *HCT*.

5 dpi

Premiers symptômes
liés à la multiplication
du virus

8-10 dpi

Mise en place du processus « VIGS » :

- dégradation des ARNs viraux : disparition des symptômes de virose
- et dégradation spécifique des ARNm endogènes du gène *HCT*

20 dpi

Premières modifications
phénotypiques liées à la répression
de l'expression du gène *HCT*

Figure I 16 : Chronologie des différents événements liés au processus « VIGS », de l'apparition des symptômes liés à la virose jusqu'à la perturbation du développement de la plante due à la répression de l'expression du gène *HCT*.

dpi : jours après infection. Le système utilisé TRV / *N. benthamiana* et les constructions virales sont présentés dans l'article 2. (Ratcliff *et al.*, 2001).

d'expression de la protéine HCT est corrélée au niveau de lignification des tissus. De plus, des analyses d'immunolocalisation de la protéine HCT ont été menées sur des coupes transversales de tige de *N. tabacum*. Elles ont permis de détecter une expression forte et spécifique de l'enzyme au niveau du phloème et dans une moindre mesure dans la zone cambiale. L'étude de la fonction, *in planta*, de l'enzyme HCT a été poursuivie par une approche de « Virus Induced Gene Silencing » (VIGS). Nous avons opté pour un système décrit récemment par le groupe de D. Baulcombe, utilisant comme vecteur viral le Tobacco Rattle Virus (TRV) et comme plante hôte *Nicotiana benthamiana* (Ratcliff *et al.*, 2001). D'après les auteurs, cette combinaison TRV / *N. benthamiana*, présente de nombreux avantages par rapport à d'autres systèmes. Elle permet de diminuer la symptomatologie liée à l'infection virale, la multiplication du virus dans les zones méristématiques et assure la maintenance de l'état de « Silencing » au-delà de 30 jours après l'infection (**Fig. I 16**) (Ratcliff *et al.*, 2001). Un fragment partiel d'ADNc codant pour l'enzyme HCT a été cloné chez *N. benthamiana*, par RT-PCR à l'aide d'oligonucléotides dégénérés. Ce fragment a été utilisé pour mener l'expérience « VIGS ». La répression de l'expression du gène codant pour HCT provoque un ralentissement de la croissance des plantes, une modification de la morphologie des feuilles et une réduction de la croissance racinaire. L'analyse histochimique et chimique de la lignine synthétisée chez ces plantes a révélé une modification importante de la lignification des tissus conducteurs. La quantité totale de lignine Klason est diminuée d'environ 15% par rapport aux plantes témoins. De plus, la lignine synthétisée est moins riche en unités diméthoxylées (S). Cette diminution est partiellement compensée par l'incorporation d'une nouvelle unité, l'unité non méthoxylée (H), dérivant du *p*-coumaroyl-CoA, le substrat de l'HCT (article 1). Pour terminer, il a été possible grâce à la combinaison des techniques d'immuno-marquage et d'histochimie, de corréler précisément la baisse de la production de l'enzyme HCT et la modification de la composition de la lignine au niveau des vaisseaux conducteurs. L'ensemble de ces données démontre l'implication de la protéine HCT dans le métabolisme des phénylpropanoïdes et son rôle essentiel dans la voie de biosynthèse de la lignine.

2. Article 2. Silencing of hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase (HCT) affects lignin biosynthesis.

Soumis le 12 mai 2003 à The Plant Cell.

**Silencing of hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase
(HCT) affects lignin biosynthesis**

Laurent Hoffmann¹, Sébastien Besseau¹, Pierrette Geoffroy¹, Christophe Ritzenthaler¹, Denise Meyer¹, Catherine Lapierre², Brigitte Pollet² and Michel Legrand¹

¹IBMP, UPR 2357 du CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France and ²Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 206, INRA-INAPG, Institut national agronomique, 78850 Thiverval-Grignon France

running title: HCT silencing affects lignin biosynthesis

corresponding author: M. Legrand, Tel.: +33 388 417280; fax.: +33 388 614442; E-mail: michel.legrand@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

ABSTRACT

The hydroxyl group in the 3-position of the phenylpropanoid compounds is introduced at the level of coumarate shikimate/quinate esters whose synthesis implicates an acyltransferase activity. Specific antibodies raised against the recombinant tobacco acyltransferase revealed the accumulation of the enzyme in stem vascular tissues of tobacco, in accordance with a putative role in lignification. An acyltransferase cDNA fragment was inserted into a tobacco rattle virus vector for functional analysis in *Nicotiana benthamiana* by using virus-induced gene silencing. Plants infected with the vector harbouring the acyltransferase sequence were severely affected in growth and development. Analysis of infected plants by immunological, histochemical and chemical methods showed that silencing of the acyltransferase gene had a major impact on lignin content and composition. In particular, a decrease in syringyl units and an increase in *p*-hydroxyphenyl units were recorded. Comparison of enzyme immunolocalization in control and silenced tissues by confocal microscopy showed a correlation between enzyme accumulation and changes of lignin composition in vascular cells. These results demonstrate the function of the acyltransferase in lignin biosynthesis.

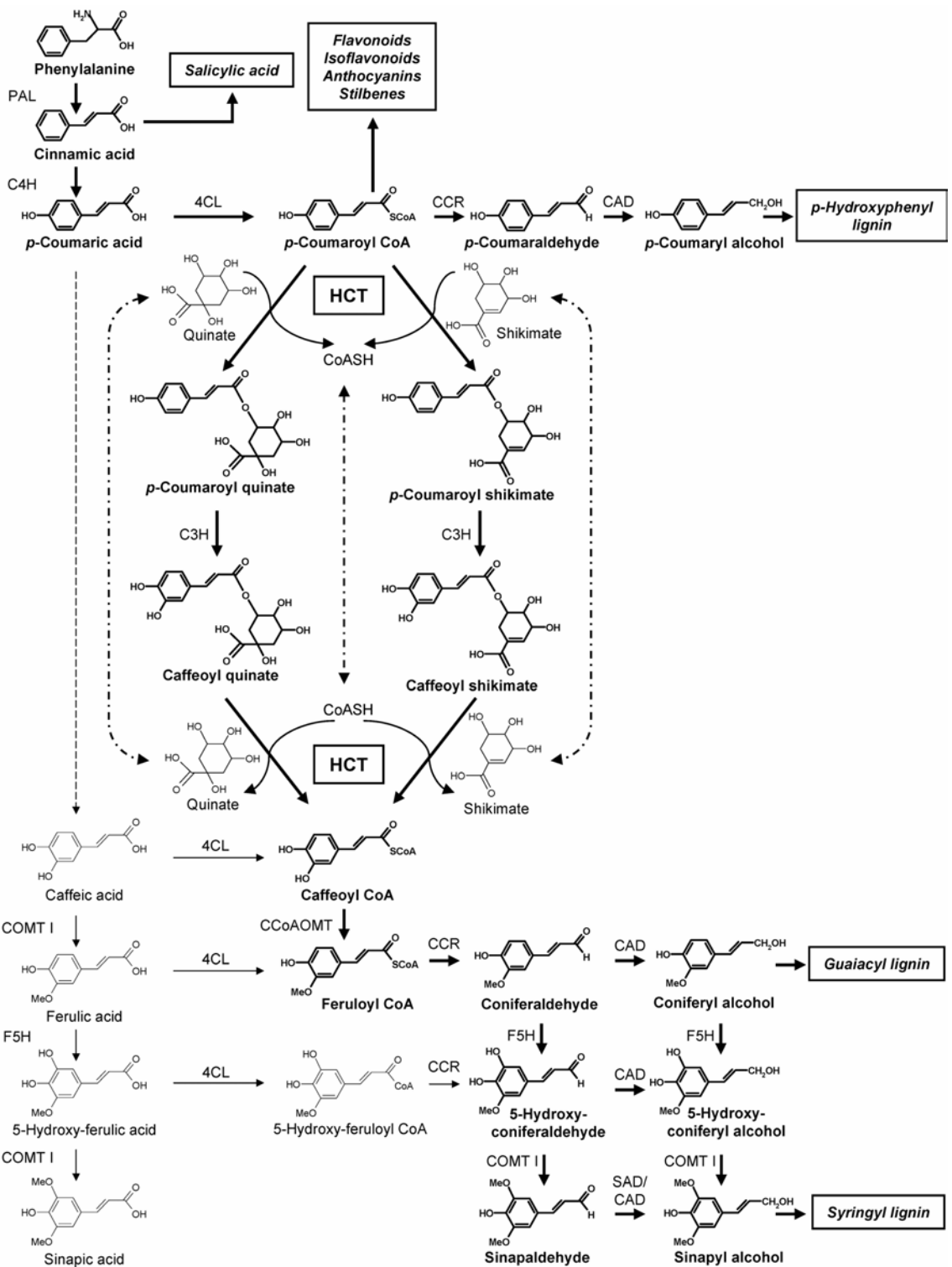


Figure 1. Current view of phenylpropanoid metabolism.

Route to lignin subunits and major products is shown in bold. The double-headed arrows illustrate CoASH, quinate and shikimate recycling after the 3-hydroxylation step. 4CL, 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CAD, cinnamyl-alcohol dehydrogenase; CCoAOMT, caffeoyl-CoA O-methyltransferase; CCR, cinnamoyl-CoA reductase; COMT I, caffeic/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; HCT, hydroxycinnamoyltransferase; PAL, phenylalanine ammonia-lyase; SAD, sinapyl-alcohol dehydrogenase.

INTRODUCTION

Plants represent an important part of the human diet, mainly as a source of energy, vitamins, minerals, fibres and antioxidants. Among the myriad of plant natural products, compounds issuing from the phenylpropanoid pathway (Figure 1) have been reported to have antioxidant effects, oestrogen-like and vasodilatation activities and anti-inflammatory and anti-cancer chemopreventive action (Bandoniene and Murkovic, 2002; Boveris et al., 2002; Burns et al., 2000; Dixon and Ferreira, 2002; Jang et al., 1997; Kahkonen et al., 1999; Lekse et al., 2001; Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001). Phenols are ingested in large quantity, for example from fruits (Bandoniene and Murkovic, 2002; Stacewicz-Sapuntzakis et al., 2001), wine (Boveris et al., 2002; Jang et al., 1997) and coffee (Olthof et al., 2001), and are thought to provide many of the health benefits associated with the consumption of plant foods.

In plants themselves, phenylpropanoids fulfil a vast array of important functions, being involved in development and interactions with the environment (Croteau et al., 2000). For example, stilbenes, coumarins and isoflavonoids are phytoalexins produced by diseased plants, flavonoids serve as UV irradiation protectants and signals in interactions with symbionts, while acetosyringone and salicylic acid are involved in plant-pathogen interactions. The phenylpropanoid metabolic pathway starts with phenylalanine (Figure 1) and provides, in addition to the products mentioned above, the precursors of lignin, which is quantitatively the second biopolymer on earth after cellulose. Lignin is a major component of plant cell wall and provides mechanical strength to tree trunks and impermeability to vascular tissues (Baucher et al., 1998; Humphreys and Chapple, 2002; Lewis, 1999).

Major progress has been made recently in the understanding of the phenylpropanoid biosynthesis pathway (Franke et al., 2002b; Hoffmann et al., 2003; Humphreys and Chapple, 2002; Schoch et al., 2001). Although free hydroxycinnamic acids have long been thought to be key intermediates, it is now clearly established that many enzymatic conversions in fact occur instead at the level of hydroxycinnamic esters, aldehydes and alcohols. Most recent breakthroughs concern the hydroxylation at the 3-position of the aromatic ring, which has been shown to be catalysed by a cytochrome P450 enzyme (Franke et al., 2002a, 2002b; Schoch et al., 2001). The *Arabidopsis* 3-hydroxylase (C3H) accepts the shikimate and quinate esters of *p*-coumarate as substrates but not the free acid form or *p*-coumaroyl CoA (Schoch et al., 2001). *Arabidopsis* mutants targeted in the C3H gene have a reduced epidermal fluorescence phenotype, accumulate *p*-coumarate esters and deposit an unusual lignin (Franke et al., 2002a, 2002b), thus indicating that *p*-coumarate esters are probably committed intermediates in the phenylpropanoid pathway. The acyltransferase that catalyses formation of C3H substrates has been recently characterised (Hoffmann et al., 2003). It uses *p*-coumaroyl CoA as acyl donor and shikimic acid or quinic acid as acceptor, yielding the shikimate or quinate ester, respectively. The acyltransferase has also been shown to catalyse the reverse

reaction, that is transfer of the caffeoyl moiety of chlorogenic acid (5-*O*-caffeoylquininate) onto CoASH leading to caffeoyl CoA, the precursor of guaiacyl and syringyl units of lignin (Figure 1). Thus this enzyme, named hydroxycinnamoyl CoA:shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase (HCT) appears to be potentially implicated in the pathway both upstream and downstream of the 3-hydroxylation step. Plant acyltransferases such as HCT are known to be involved in diverse substitution reactions implicated in the biosynthesis of a large number of secondary metabolites (Croteau et al., 2000; St-Pierre and De Luca, 2000). Tobacco HCT belongs to the BAHD family, a superfamily of CoA-dependent acyltransferases which is organised into distinct evolutionarily conserved groups (Hoffmann et al., 2003; St-Pierre and De Luca, 2000; St-Pierre et al., 1998).

Here we report on the immunolocalization of tobacco HCT and show that it is actively expressed in lignified tissues, in agreement with a putative role in lignin biosynthesis. To ascertain the precise function of HCT *in planta*, we used a *tobacco rattle virus* (TRV)-based virus-induced gene silencing (VIGS) technique as a gene knockout system (Ratcliff et al., 2001). *Nicotiana benthamiana* plants deficient for HCT function were affected in development and lignin biosynthesis. Compared to controls, Klason lignin was decreased by 15%, and the lignin polymer was enriched in hydroxyphenyl (H) units while the proportion of dimethoxylated syringyl (S) units was decreased. HCT immunolocalisation and lignin fluorescence were compared in stem sections of control and HCT-silenced plants by confocal laser scanning microscopy. Combined with histochemical staining of lignin, the observations revealed a strict correlation between the level of HCT accumulation and the composition of lignin. Taken together, these results demonstrate that HCT plays a critical role in lignin biosynthesis.

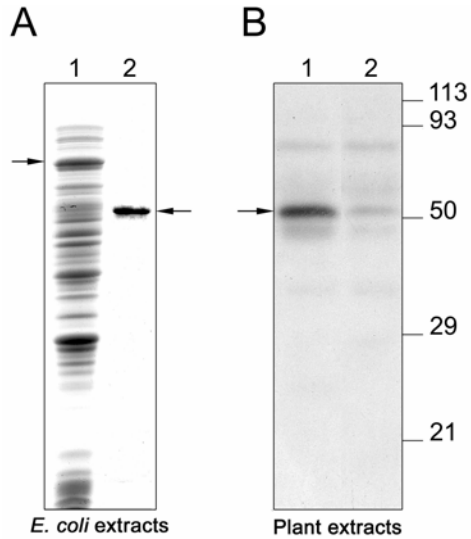


Figure 2. Specificity of polyclonal antibodies raised against the purified recombinant HCT protein.

(A) The tobacco HCT clone was expressed in *E. coli* cells and the fusion protein (arrow, lane 1) affinity-purified and cleaved to yield the purified recombinant protein (arrow, lane 2) for injection to rabbits.

(B) A crude protein extract (3 μ g) of tobacco stems was immunoblotted with the anti-HCT polyclonal antiserum (lane 1) or with a serum aliquot that had been incubated in the presence of the purified recombinant HCT protein (lane 2, see methods). The arrow indicates the position of HCT protein.

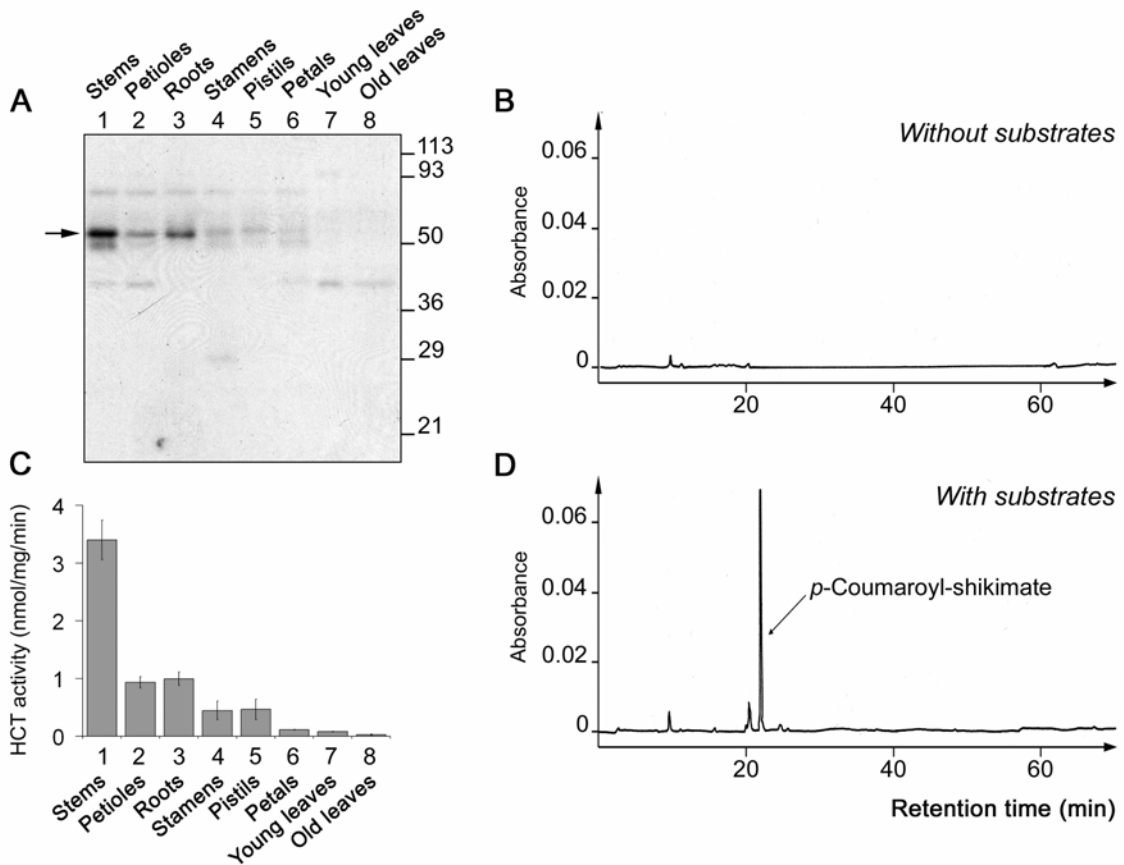


Figure 3. HCT expression in different tissues of *N. tabacum* plants.

(A) Protein extracts prepared from different plant tissues were analysed by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and immunodetected with polyclonal antibodies raised against the purified recombinant protein. Expression levels in stems (lane 1), petioles (lane 2), roots (lane 3), stamens (lane 4), pistils (lane 5), petals (lane 6), young and old leaves (lanes 7 and 8, respectively) were compared. The arrow on the left indicates the migration of the HCT protein and on the right is indicated the position of markers of known molecular mass (given in kDa).

(B), (D) HPLC analysis of a plant extract in the absence (B) or in the presence (D) of *p*-coumaroyl-CoA and shikimate as substrates.

(C) The amount of *p*-coumaroylshikimate formed upon incubation was used to calculate HCT activity in the different extracts analysed in A. Mean values and standard errors were calculated from 3 independent experiments.

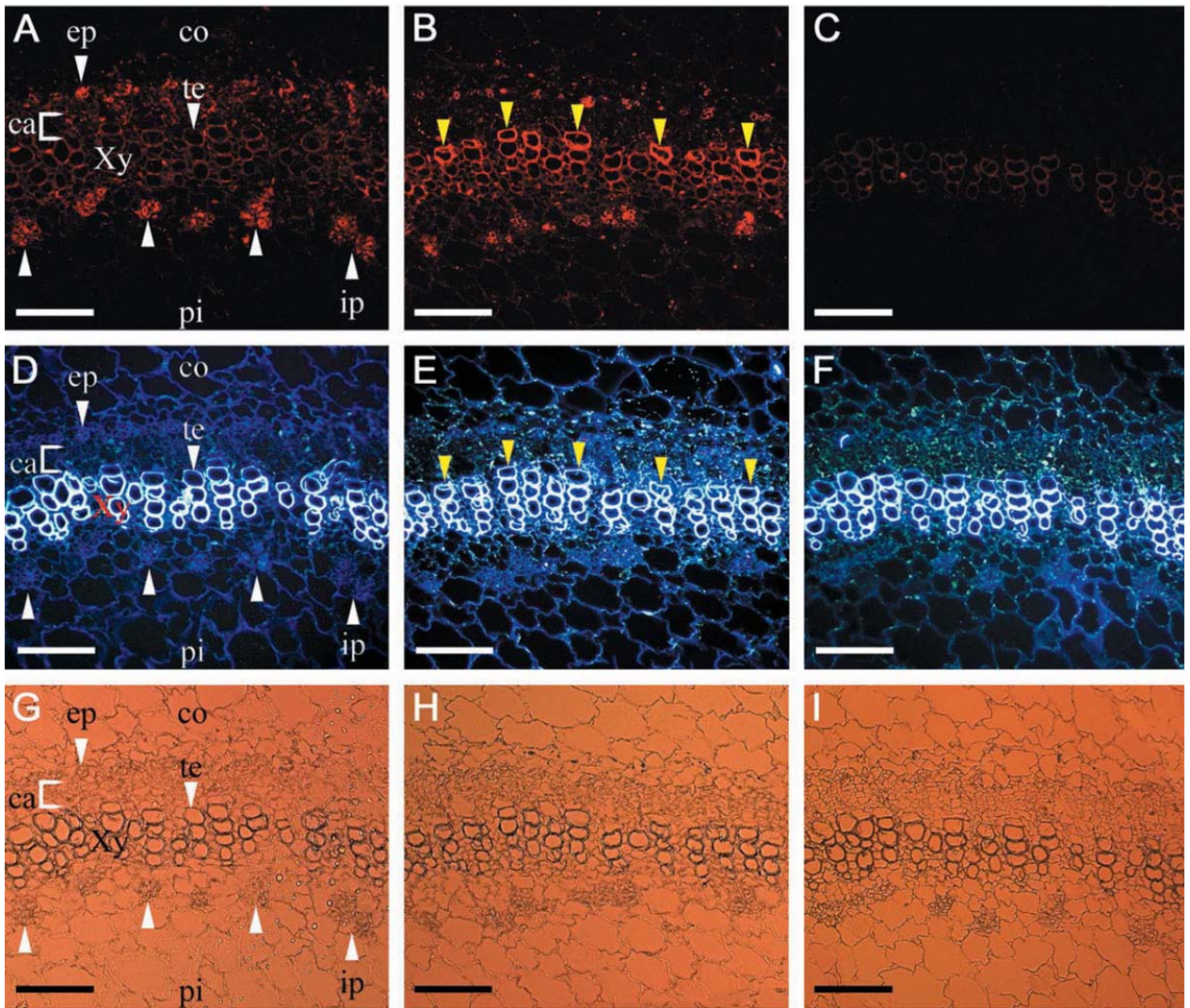


Figure 4. Comparative immunolocalization of HCT and CCoAOMT in tobacco stem sections.

(A), (B), (E): Immunofluorescence labelling obtained with anti-HCT **(A)**, anti-CCoAOMT **(B)** and HCT pre-immune serum **(C)**.

(D), (E), (F): Autofluorescence corresponding to sections **(A),(B), (C)**, respectively.

(G), (H), (I): Anatomy of the tissues as observed under bright field.

Ca, cambium; co, cortex; ip, internal phloem; ep, external phloem; pi, pith; te, tracheary element; xy, xylem.

Bars = 200 μ m.

RESULTS

Obtention of an antiserum specific for tobacco HCT

The tobacco HCT protein (Hoffmann et al., 2003) was expressed in *E. coli* cells as a fusion protein with glutathione S-transferase (GST) (Figure 2A, lane 1). After affinity purification on glutathione beads, the GST tag was cleaved to yield the purified HCT protein (Figure 2A, lane 2). The protein preparation was then injected into rabbits to raise polyclonal antibodies. The antiserum was used in immunoblotting experiments to probe protein extracts from tobacco stems and revealed one major protein with a molecular mass similar to that of the recombinant protein, i.e. 51 kDa (Figure 2B, lane 1). When the antibodies were pre-incubated in the presence of purified recombinant protein, subsequent recognition of the 51-kDa band was strongly inhibited (Figure 2B, lane 2), demonstrating that the polyclonal antibodies specifically recognise the HCT protein in the plant extract.

Study of HCT expression in tobacco

HCT expression in different tobacco tissues was investigated in immunoblotting experiments (Figure 3A). The strongest signals were observed with extracts from internodes of tobacco stems (Figure 3A, lane 1). Lower levels of expression were detected in roots and petioles (Figure 3A, lanes 2 and 3) whereas only faint bands were detected in extracts from different flower tissues (Figure 3A, lanes 4 to 6). Finally, the level of expression in leaves was below the detection limits of the immunological method (Figure 3A, lanes 7 and 8). The same protein extracts were assayed for acyltransferase activity by incubating plant extracts with (Figure 3D) or without (Figure 3B) substrates and quantifying reaction products by HPLC. After incubation of the enzyme preparation in the presence of the two substrates, a new peak appeared that was identified as *p*-coumaroylshikimate (Figure 3D). The method proved highly sensitive since even the low activity present in leaves could be accurately measured (Figure 3C). Moreover, these results indicate that HCT expression level is correlated with the degree of lignification of the tissue.

To further address the putative role of HCT in lignin biosynthesis, we investigated the localisation of HCT in lignifying tissues in comparison with that of a typical lignification enzyme, CCoAOMT (Figure 4). The tissues were observed either by epifluorescence microscopy (Figure 4A-F) at different excitation/emission wavelengths (see Methods) to reveal Alexa 568 immunolabelling (Figure 4A-C) and lignin autofluorescence (Figure 4D-F), or under bright field conditions to reveal the anatomy of the tissues (Figure 4G-I). All images were acquired using the same exposure time to allow comparison between the different panels. The top panels of Figure 4 present serial thin sections of tobacco stems that have been

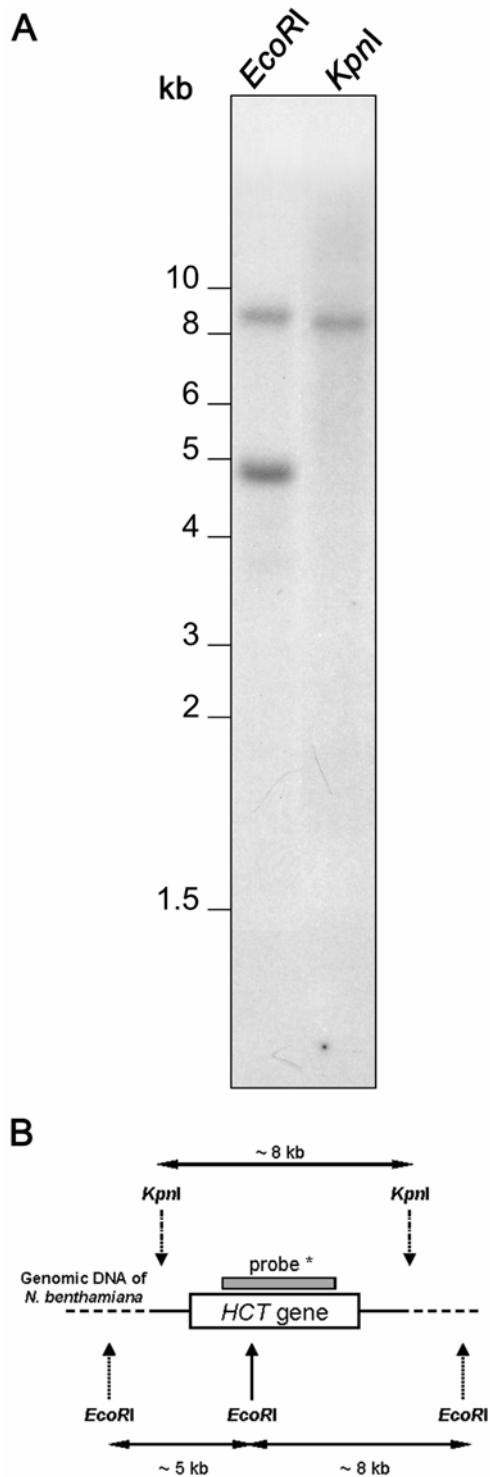


Figure 5. One copy of the *HCT* gene is present in *N. benthamiana* genome.

(A): Gel blot analysis of *EcoRI*- and *KpnI*-digested genomic DNA (40 μ g per lane) probed with the *HCT* cDNA. The position of length markers is given on the left.

(B): Schematic drawing of the relative position of the *HCT* coding sequence and *EcoRI* and *KpnI* restriction sites as inferred from **(A)**.

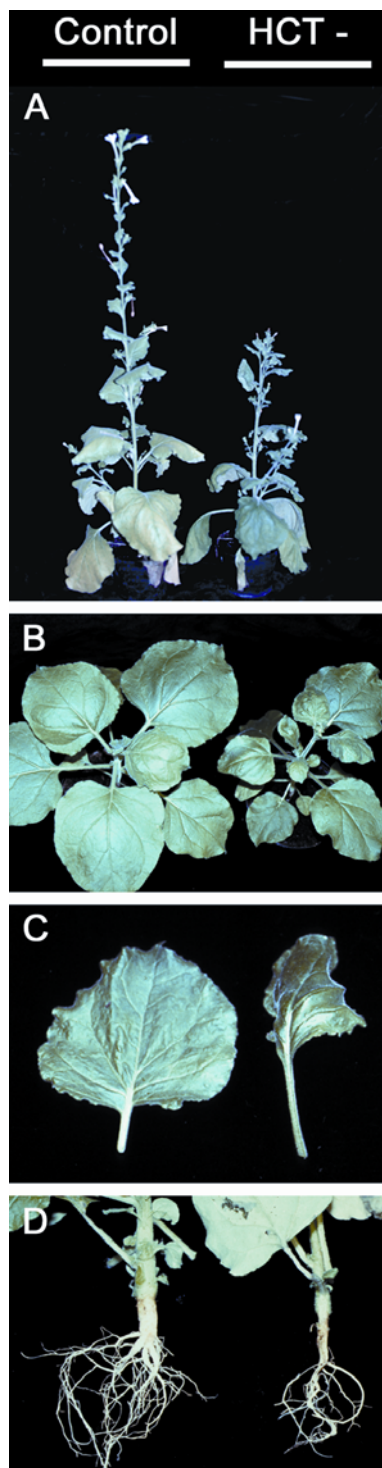


Figure 6. Phenotypes of *N. benthamiana* plants subjected to VIGS of *HCT* gene.

Impacts on the whole plant size (A), leaves size and shape (B and C) and root growth (D) are shown. On the left of each photograph is a control plant infected with the TRV vector carrying a GFP sequence and on the right is a plant infected with the TRV vector containing the *HCT* fragment (HCT-).

incubated with antisera directed against the HCT protein (Figure 4A) or the CCoAOMT protein (Figure 4B) or with a preimmune serum (Figure 4C). Only a very low signal was observed in the sample treated with the pre-immune serum (Figure 4C). This low background colocalized with lignified xylem cells (compare panel C to the intense autofluorescence generated by the accumulation of phenolic polymers within the walls of the xylem tracheid elements in panel F) and was also detected when the secondary antibody was omitted (data not shown). The background signal is therefore likely due to the weak autofluorescence of lignin at λ_{Ex} 515 - 565 nm/ λ_{Em} 582.5 - 627.5 nm. In contrast to the preimmune control, strong labelling was observed with specific sera raised against HCT (Figure 4A) or CCoAOMT (Figure 4B). In the case of HCT, the signal was mainly localised within the external and inner phloem cells (white arrowheads) and to a lesser extent in the cambium zone. When compared to the background detected in xylem with the preimmune serum (Figure 4C), the signal detected in xylem with the anti-HCT serum (Figure 4A) was low but significant. This is in contrast to the CCoAOMT labelling that was mainly localised in the young xylem cells that are actively lignifying (Figure 4B, yellow arrowheads) and to a lesser extent in association with the older xylem cells situated beneath. This localisation of CCoAOMT is in agreement with the activity of the enzyme, which catalyses the synthesis of feruloyl CoA, the precursor of both guaiacyl and syringyl subunits of lignin that are deposited in xylem tracheids. As for HCT, CCoAOMT labelling was also detected in internal and external phloem cells (Figure 4B) but almost no signal was present within the cambium zone from which the xylem cells differentiate. No signal was found in cortex and pith tissues with either serum. Thus, it appears that the distribution of HCT and CCoAOMT in vascular tissues is not identical, despite their proximity in the lignin biosynthetic scheme (see Figure 1).

Impact of HCT silencing on *N. benthamiana* plant development

We have shown previously that tobacco HCT belongs to the BADH family of acyltransferases (Hoffmann et al., 2003; St-Pierre and De Luca, 2000). An partial HCT cDNA from *N. benthamiana* was cloned by RT-PCR using primers designed from conserved sequences in BADH gene family (see Methods). A 957 bp fragment was isolated that shared 96 % homology with the tobacco HCT cDNA (data not shown) and was used as probe to analyse genomic DNA of *N. benthamiana* by DNA gel blotting (Figure 5A). Restriction of the plant DNA with *EcoRI* (one site in the gene coding sequence) or *KpnI* (no sites) indicated that only one copy of HCT is present in *N. benthamiana* genome (Figure 5B).

The HCT cDNA fragment was introduced in the TRV vector and VIGS was used to silenced the *N. benthamiana* HCT gene in infected plants. Figure 6 presents the effects of HCT silencing on plant development. As controls (plants on the left in Figure 6) we used plants infected with TRV vector containing an unrelated sequence, the sequence of the green

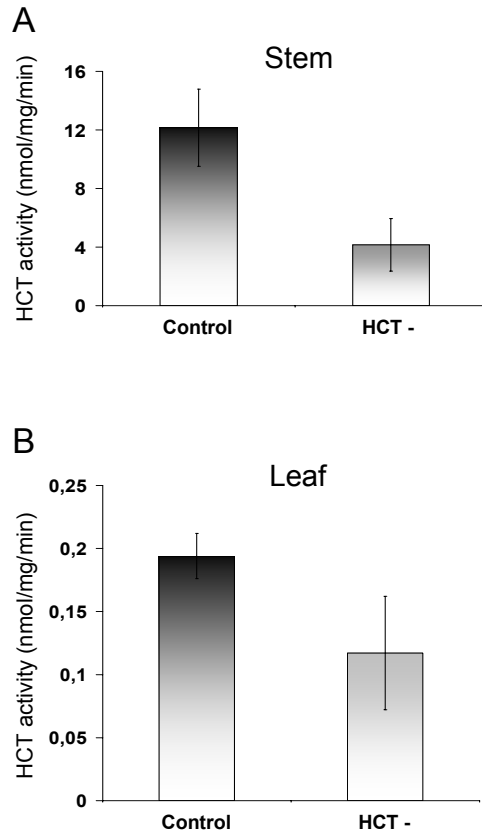


Figure 7. HCT activity in silenced plants.

Enzyme activity was measured in stem and leaf tissues of control (TRV-GFP infected) and silenced (TRV-HCT infected, HCT-) plants as shown in Figure 3D. Nine plants were individually analysed in each case and used to calculate mean values and standard deviations.

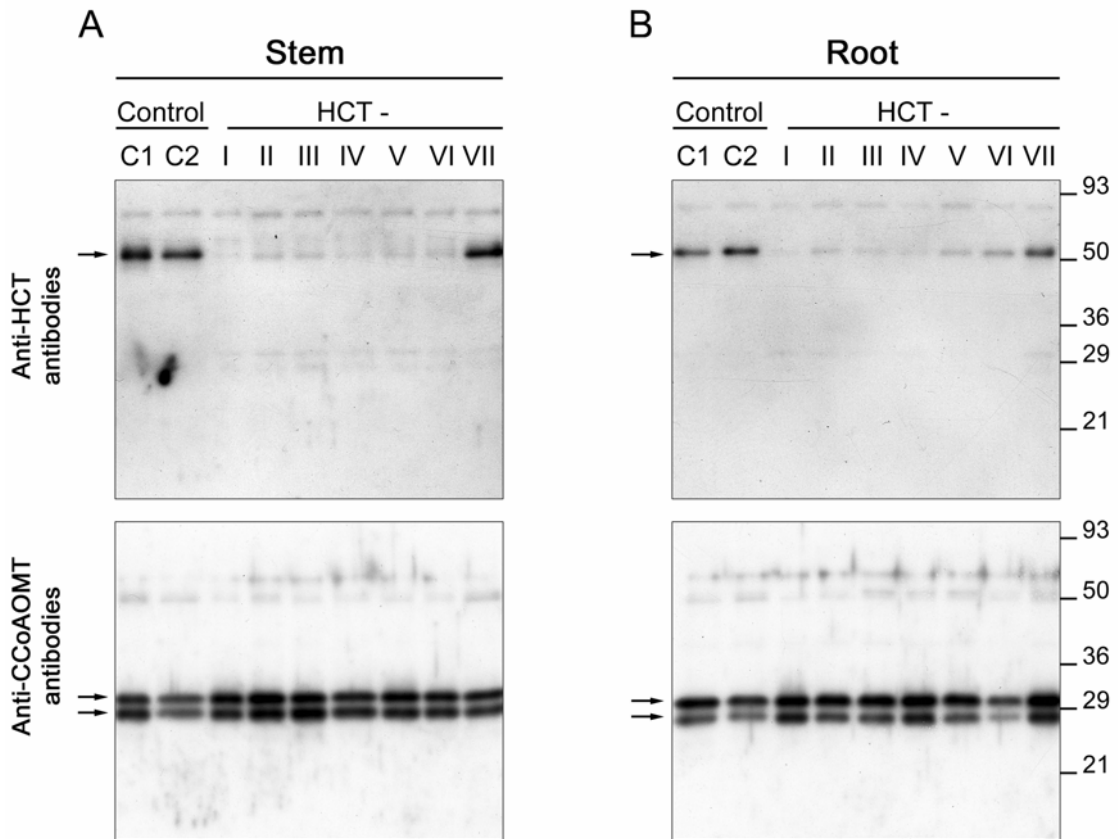


Figure 8. HCT silencing in stem (A) and root (B) tissues of *N. benthamiana*.

Protein extracts (3.5 μ g) from stems (internode 5) or roots were immunodetected with specific antibodies raised against tobacco HCT (top panels) or CCoAOMT (bottom panels) proteins. HCT and CCoAOMT contents of 2 representative controls (C1 and C2) and 7 TRV-infected plants (HCT-, I-VII) are presented .

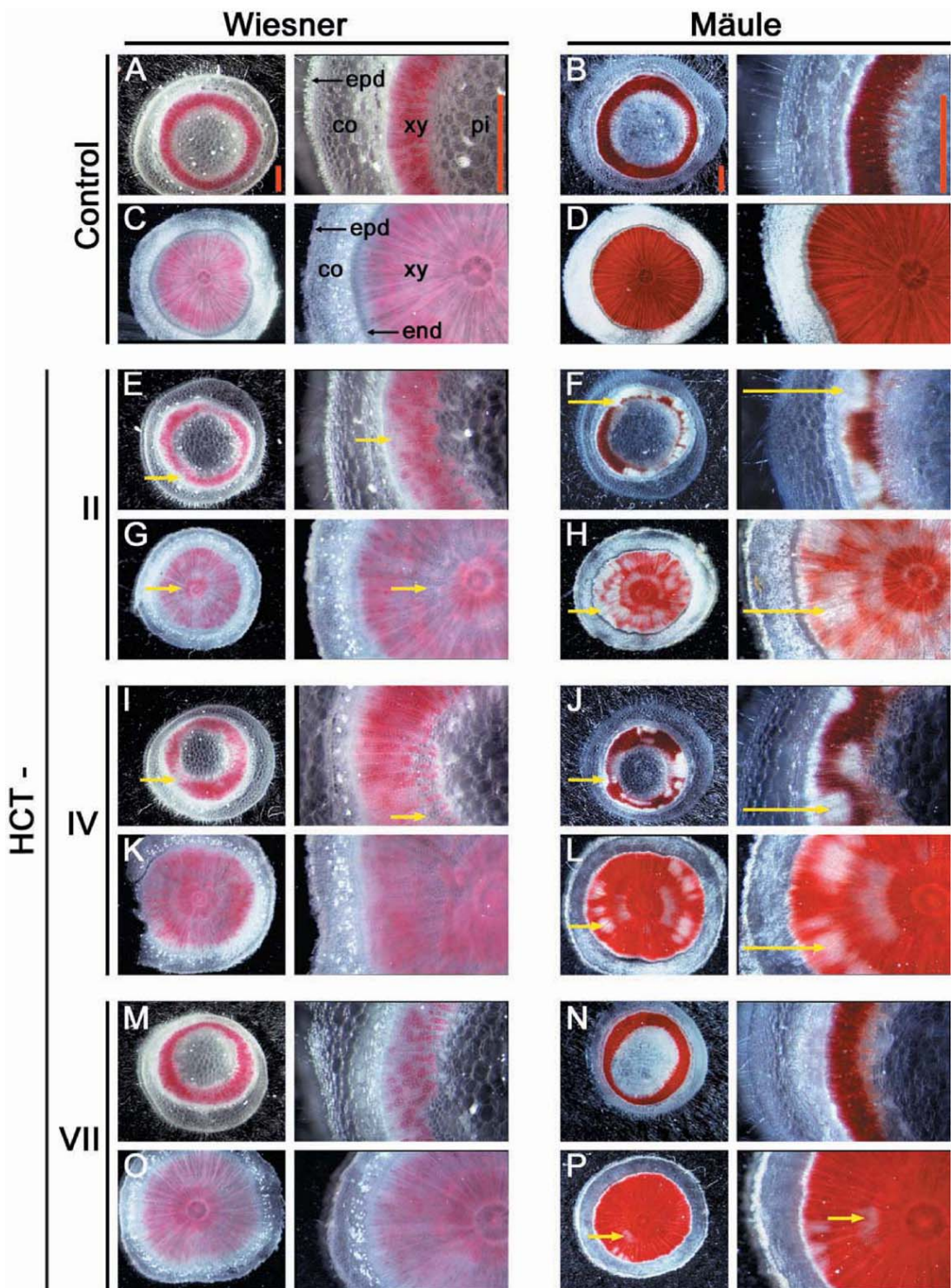


Figure 9. Histochemical analysis of the effects of HCT suppression on lignin biosynthesis.

Sections of stems (A, B, E, F, I, J, M, N) and roots (C, D, G, H, K, L, O, P) were stained using Wiesner (left panels) or Maüle (right panels) methods. Panels A-D show sections of a representative control, panels E-H show sections from a plant with a strong phenotype, panels I-L show sections from a plant with an intermediate phenotype and panels M-P show sections of a plant with no visible phenotype. Arrows indicate tissue zones with attenuated lignin staining. All the pictures in one column are at the same scale (indicated at the top, bars = 1 mm). Epd, epidermis; end, endodermis; other abbreviations are as in Figure 4.

fluorescent protein (GFP). When the TRV vector harboured the HCT sequence, plant development was affected to different extents, phenotypes ranging from no visual phenotype to a severe growth phenotype. In the example shown in Figure 6 (plants on the right), whole plant size was severely reduced (Figure 6A), leaf morphology was affected (Figures 6B and 6C) and root development was inhibited (Figure 6D).

The impact of HCT silencing at the molecular level was first evaluated by comparing acyltransferase activity extractable from stem and leaf tissues of silenced and control plants (Figure 7). Activity level in stems (Figure 7A) was reduced by 3-fold in silenced tissues compared to controls. A much lower level of activity was measured in leaves of control plants and this level of activity was further decreased by about 2-fold by silencing (Figure 7B). The level of HCT inhibition was also evaluated by immunoblotting in a set of plants differently affected in their development. Figure 8 presents HCT expression compared to CCoAOMT expression in two control plants (C1 and C2) infected with the GFP-vector and in seven plants infected with the HCT-vector (HCT- plants). Expression levels were evaluated by immunoblotting protein extracts from stems (Figure 8A) or roots (Figure 8B). In the controls (C1 and C2), HCT protein (upper panels) and the two CCoAOMT isoforms (bottom panels) (Maury et al., 1999) were readily detected in stem and root tissues. In tissues of infected plants I to VI (Figures 8A and 8B), the HCT protein was barely detectable, whereas CCoAOMT expression was not affected, in accordance with the specificity of the VIGS phenomenon (Ratcliff et al., 2001). In plant VII, HCT expression was much less reduced, thus indicating that VIGS was less efficient in this particular plant, which showed attenuated developmental defects (data not shown). These data confirm very reduced HCT levels in most of the TRV-HCT infected plants and suggest that the amplitude of the impact on plant development is correlated with the extent of HCT silencing.

Impact of HCT silencing on lignin biosynthesis

Since HCT mainly localises in lignified tissues (Figures 3 and 4), lignification in stem and root tissues of TRV-infected *N. benthamiana* plants was first evaluated by histochemical methods. Figure 9 presents hand sections of stems and roots of plants that have been infected with TRV-GFP or TRV-HCT vectors. We used Wiesner's staining that reflects lignin quantity and Maüle's staining which specifically detects lignin syringyl units (dimethoxylated units, see Figure 1). In control samples, staining was strong in xylem vascular tissues, appearing as coloured rings in stem sections (Figures 9A and 9B) and as coloured disks in root tissues (Figures 9C and 9D). In contrast, histochemical staining detected changes in the lignification of both stem and root vascular tissues of the TRV-HCT infected plants. Wiesner staining was significantly affected only in a few cases, as in the sections shown in Figures 9E and 9G, whereas Maüle staining proved much more sensitive and revealed the appearance of unstained

Table 1: Effects of *HCT* silencing on lignin content and structure in 3 month-old *N. benthamiana* stems.

	Non-infected	TRV-GFP infected	TRV-HCT infected
Klason lignin ^a (KL)	10.9 ± 0.4 (100 ± 4)	11.2 ± 0.3 (103 ± 3)	9.32 ± 0.19 (85 ± 2)
Thioacidolysis yield in H, G and S monomers (µmol per g KL) ^b			
H	2.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1	85.1 ± 3
G	426 ± 1	514 ± 4	323 ± 2
S	1033 ± 43	1165 ± 28	683 ± 1
Total (H+G+S)	1462	1683	1091
Molar ratio (H/G/S)	0.2 / 29.1 / 70.7	0.2 / 30.6 / 69.2	7.8 / 29.6 / 62.6
% units only involved in β-O-4 bonds ^c	37	42	27

^aKlason lignin is expressed as weight percent of extract-free sample (mean value and standard deviation of 4 replicate analyses). Values in parentheses are relative to uninfected control taken as 100 %.

^b Mean value and standard deviation of duplicate analyses.

^c The percentage of lignin units only involved in β-O-4 bonds is calculated with the assumption that the average Mr of lignin units is 200 and that the recovery yield of thioacidolysis monomers from parent β-O-4 structures is 80%.

white zones in the xylem tissues of all plants examined (marked by arrows in Figure 9). The youngest outmost tissues were the most affected in stem as well as in root tissues. In the Maüle-stained sections, the extent of the white zones depleted in syringyl units varied between individual plants, as exemplified by plants II, IV and VII in Figure 9. It is of note that only minor effects on lignin composition were detectable in roots of plant VII (Figure 9P) which was only moderately silenced for HCT (see Figure 8) and had no growth phenotype. These histochemical data indicate that *HCT* repression has a direct effect on lignin synthesis.

The impact of HCT silencing on lignin structure was further studied by chemical methods. The amount of lignin in 3 month-old plants, was estimated by the gravimetric Klason method on stem material following solvent extraction (referred from now as extract-free samples). As shown in Table 1, the non-infected and TRV-GFP infected controls had similar lignin levels. In contrast, lignin accumulation was decreased by fifteen percent in silenced plants, consistent with the relative small effects observed with the Wiesner stain (Figure 9). Lignin structure was studied by thioacidolysis degradation, which gives rise to H, G and S thioethylated lignin-derived monomers from H, G and S lignin units involved in labile β -O-4 ether bonds. Therefore, the total yield of thioacidolysis monomers gives a measure of the proportion of lignin units involved in such bonds. Conversely, this yield is reduced when the proportion of resistant interunit bonds in lignin is high. Table 1 presents the results of thioacidolysis analysis of lignin from a typical experiment. The yields revealed that lignin of non-infected and TRV-GFP infected control samples had about 40% units only involved in β -O-4 bonds. In contrast, this percentage was substantially lower (27%) in HCT-silenced plants (Table 1), indicating a more condensed lignin compared to controls. Together with the enrichment in resistant interunit lignin bonds, thioacidolysis revealed that the relative proportions of the main lignin units were markedly altered. As shown in Table 1, when subjected to thioacidolysis the two controls essentially released the G and S monomers (S/G molar ratio of 2.4 for the non-infected and 2.3 for the TRV-GFP infected), while the H monomer was recovered as a trace component. In contrast, the latter non-methoxylated monomer was obtained in substantial relative amounts (8% of the lignin-derived monomers) from the TRV-HCT infected plants. This relative increase in H monomer did not affect the proportion of G monomer, which was 29-30% in all cases, although the S monomer was reduced from 69-70% in the controls to 63% in the HCT-silenced plants (Table 1, molar ratio values). This result is in agreement with the fact that large areas of some stem sections did not stain with Maüle reagent (Figure 9). These changes in lignin composition are consistent with the increase of resistance toward thioacidolysis degradation (i. e. a lower proportion of labile β -O-4 linkages, Table 1) since the C-5 position of the aromatic ring is available for highly resistant carbon-carbon bonds in the H unit but not in the S unit. Thus, it appears that changes in the lignin structure of silenced plants mainly arise from a decrease in dimethoxylated S units and a concomitant increase in non-methoxylated H units.

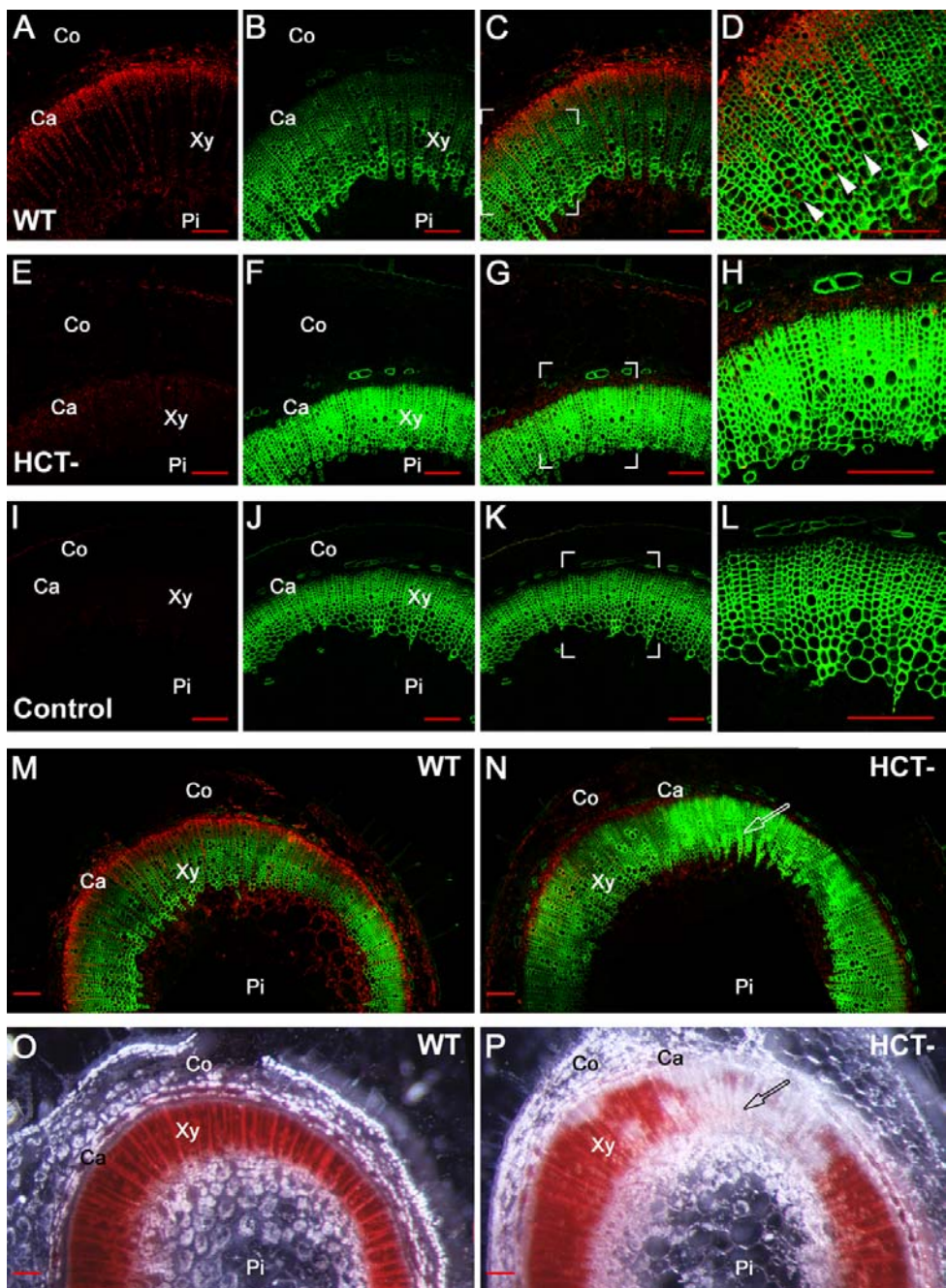


Figure 10. HCT immunolocalization in transverse stem sections from WT (TRV-GFP) and silenced (HCT-) *N. benthamiana* plants.

(A) to (D) HCT immunolocalization in WT *N. benthamiana*.

(E) to (H) HCT immunolocalization in HCT-silenced *N. benthamiana*.

(I) to (L) HCT control immunolabelling. Labelling was performed on WT *N. benthamiana* in the absence of primary antibodies.

(A), (E), (I) Typical distribution of the HCT immunolabelling in WT (A), silenced (E) and control (I) samples, respectively. HCT labelling is intense and mainly detected within the cambium (Ca) of the WT. Strongly reduced labelling is observed in the cambium of the HCT- sample. Almost no signal is detected in the negative control.

(B), (F), (J) Corresponding autofluorescence of the lignin as observed upon 488/505-545 nm excitation/emission wavelengths. Note that autofluorescence of the lignin is higher and less uniformly distributed in the silenced tissues compared to the WT plants.

(C), (G), (K) Merged images of A + B, E + F, I + J, respectively.

(D), (H), (L) Higher magnification views of the boxed regions shown in (C), (G), (K), respectively. Note the HCT labelling within the xylem ray cells of WT plants (arrowheads).

(M), (N) Overall distribution of HCT (red) and lignin (green) in transverse stem sections from WT and silenced *N. benthamiana*, respectively.

(O), (P) Maüle staining corresponding to the samples shown in (M), (N), respectively. Note that the unstained area of the xylem shows a higher level of autofluorescence (arrows).

All images were acquired by CLSM and processed under exactly the same conditions to allow comparison between the different panels. Bars = 200 µm. Abbreviations as in Figures 4 and 9.

To ascertain that the modifications of the lignin composition observed in the silenced plants strictly correlated with the extent of changes in HCT accumulation, the same stem sections from non-silenced (WT) and silenced (HCT-) *N. benthamiana* plants were immunolabelled using anti-HCT antibodies, analysed by CLSM for labeling and autofluorescence and then further processed for Maüle staining as illustrated in Figure 10. In control non-silenced plants, HCT labelling (Figure 10A, red signal) was intense and uniformly distributed within the cambium zone surrounding the strongly autofluorescing xylem cells (Figure 10B). Some HCT labelling was also detected in the xylem cells, as is readily visualised on merged images (Figures 10C and 10M). When observed at higher magnification, HCT labelling was also revealed to radiate within ray cells (arrowheads, Figure 10D). Using the same CLSM settings to allow comparison of the data, overall HCT labelling of silenced plants was faint (Figures 10E and 10G, red signal) and its distribution within the cambium was much less uniform than in control plants (compare red signal in Figures 10M and 10N). At high magnification, the faint signal within the cambium was better visualised and almost no labelling was apparent in the xylem ray cells (Figure 10H). Contrarily to the non-silenced plants in which the lignin autofluorescence was rather uniform, silenced plants showed large patches of intensely autofluorescent xylem cells (compare the green signal intensity in Figures 10B and 10F, 10D and 10H, 10M and 10N, respectively). In the absence of primary antibody, no red signal was detected at the wavelengths used to reveal Alexa 568 labelling (Figures 10I, 10K, 10L); only the uniform distribution of the autofluorescence of the xylem cells was visible at appropriate wavelength (Figures 10J to 10L), confirming the specificity of the HCT antibody.

To further address the extent and nature of lignification that occurred in the samples used for HCT immunolabelling (panels A to H), the same stem sections were recovered after CLSM observation and processed for Maüle staining. As shown in Figure 10O and in agreement with previous observations (see Figure 9), xylem vascular tissues from non-silenced plants appeared as uniformly coloured rings, whereas those from silenced plants were variegated. Interestingly, the white patches of cells depleted in syringyl units (as indicated by the arrow in Figure 10P) corresponded to the areas where the lignin autofluorescence intensity was the highest (Figure 10N, arrow). Therefore, reduced HCT activity strictly correlated *in vivo* with reduced lignin syringyl content and increased lignin autofluorescence. It is concluded that lignin biosynthesis is strictly dependent on HCT activity *in vivo* and its reduction by VIGS is probably at the origin of the altered spectral characteristics of lignin.

Table 2: Impact of *HCT* silencing on cell wall degradability by cellulase.

	Non-infected	TRV-GFP infected	TRV-HCT infected
Weight loss (%)	33.9 ± 0.7	36.7 ± 2.3	57.4 ± 1.4

The extent of degradation by cellulase was expressed as the percentage of loss in sample weight at the end of incubation with the enzyme (see Methods). Data are mean values and standard errors from duplicate experiments.

Impact on cell wall degradability

We examined the consequences of the changes in lignin content and structure upon the resistance of plant cell walls to hydrolase activity. The susceptibility of the tissues to cellulase activity was studied and the results are presented in Table 2. The cell walls of TRV-HCT infected tissues were degraded to a much higher extent than controls, since weight loss reached 160% of the control value (Table 2). This was likely the result of facilitated cellulase action in tissues in which lignification had been altered as a result of HCT silencing.

DISCUSSION

The recent characterisation of an acyltransferase (HCT) (Hoffmann et al., 2003) capable of synthesising *p*-coumaroyl shikimate and *p*-coumaroyl quinate esters, and of the cytochrome P450 3-hydroxylase that uses the *p*-coumaroyl esters as substrates (Franke et al., 2002a, 2002b; Schoch et al., 2001) has profoundly changed our view of the phenylpropanoid biosynthetic pathway (Humphreys and Chapple, 2002). Here, we have investigated the role of HCT in lignin biosynthesis *in planta* by immunolocalizing the enzyme in wild-type and VIGS HCT-silenced plants.

Using a specific antiserum raised against the purified recombinant protein for probing various plant extracts, HCT was shown to accumulate in lignified tissues of stems and roots (Figure 3). Immunocytochemical localisation of HCT in vascular tissues was compared to that of CCoAOMT, which has previously been associated with lignification in various plants (Inoue et al., 1998; Maury et al., 1999; Ye, 1997). Differences in the spatial and temporal enzyme distribution were demonstrated for CCoAOMT and COMT in alfalfa tissues (Inoue et al., 1998) and may be at the origin of subtle variations in lignin of distinct cell types. The comparative localisation of CCoAOMT and HCT in tobacco showed that both enzymes accumulate exclusively in vascular tissues and no signal was seen in the pith and cortex of stems. HCT protein staining was much more evident in inner and external phloem than in xylem cells (Figure 4). Faint labelling was also detectable in cambium cells where no signal was recorded with anti-CCoAOMT antibodies. Inversely, HCT was not clearly detected in differentiating young xylem cells, a major site of CCoAOMT accumulation. Thus, a distinct spatial repartition of the two lignin biosynthetic enzymes was found and may be related to their relative position in the pathway (Figure 1) and their implication at different stages of the cell lignification process.

Studying the impact of VIGS of HCT on infected *N. benthamiana* plants provides unequivocal proof of the involvement of HCT in lignin biosynthesis. HCT-silenced plants exhibited profound changes in plant development, lignin content and structure and susceptibility of the cell walls to enzymatic degradation. Comparison of enzyme immunolocalization in control and silenced plants by confocal microscopy demonstrated a correlation between the disappearance of enzyme labelling in vascular cells and the impact on lignin structure. In silenced *N. benthamiana* plants, accumulation of the gene product in the cambium zone and in xylem ray cells was clearly diminished compared to controls. Cell walls of tissues that underwent silencing displayed surprisingly higher autofluorescence, suggesting that the enrichment of lignin in H units demonstrated after thioacidolysis may result in alterations of its spectral properties. This phenomenon could be linked to the fact that H lignin units are essentially terminal lignin units with free phenolic groups (Lange et al., 1995). The decrease in HCT protein accumulation in xylem tissues also strictly correlated with a decrease

in lignin S unit content as revealed by histochemical staining and chemical analysis. These changes in enzyme accumulation and lignin composition appeared unevenly distributed within the stem tissues of infected plants, suggesting some heterogeneity in the effects of silencing which may reflect the cell-to-cell spread of the virus or the replication rate of the TRV vector at the cellular level. It is known that the efficiency of VIGS is indeed dependent on virus replication, at least at the stage of VIGS initiation (Ruiz et al., 1998). In TRV-infected plants, the virus multiplication rate is initially high, then declines and is maintained at a low level at later stages of infection (Ratcliff et al., 2001). By evading the plant defense mechanism, the virus persists in the infected plants and maintains the gene silencing phenomenon. A signal may also propagate into uninfected cells of the plant and trigger silencing (Voinnet and Baulcombe, 1997; Ratcliff et al., 2001).

We do not know whether the fluctuations in HCT accumulation and effects on lignin arose from varying levels of virus multiplication or were a consequence of a compensation process from the plant. In any event, the HCT-targeted VIGS phenomenon leads to a plant vasculature with a lignin unusual in its enrichment in H units, its depletion in S units and its heterogenous nature. It would be of interest to examine in depth the impact of such abnormal lignin synthesis on cell differentiation. However, the currently available histochemical methods only allow detection of gross changes in lignin structure while characterization of more subtle alterations, possibly affecting different cell types, would demand novel spectroscopic methods for *in situ* studies. It has been established that, during cell wall differentiation, patterns of lignification are well defined, leading to the overall architecture of the secondary cell wall: first, *p*-coumaryl alcohol is predominantly deposited into the middle lamella and cell corners (H unit, Figure 1), followed by coniferyl alcohol which is mainly laid down in the secondary wall (G unit); finally, sinapyl alcohol is deposited at the late stages of lignification (S unit, Lewis, 1999). In VIGS-silenced plants the proportion of monolignols is modified and resulting alterations in the cell wall ultrastructure could be revealed, for instance, by *in situ* immunocytochemical analysis of lignin substructure epitopes using transmission electron microscopy (Ruel et al., 2001). Such studies should improve our knowledge of the precise spatio-temporal regulation of the secondary cell wall assembly.

In view of the upstream position of HCT in the pathway (Figure 1), its repression most probably affects not only lignin but also other metabolites, particularly soluble compounds. A complete appraisal of the impact of HCT silencing on global phenylpropanoid metabolism would require investigation of the intermediate pools, for example by HPLC. For such studies, the regulation of VIGS establishment and maintenance could introduce an additional level of complexity compared to the analysis of a mutant plant. For instance, a rather surprising point that merits confirmation is the differential effect of HCT repression on G and S lignin units, which are both downstream of HCT (Figure 1). Aside from the unlikely occurrence of an alternative pathway, the predominant effect on S synthesis suggests that,

when the metabolic flux is lowered by HCT repression, the reduction of coniferaldehyde into coniferylalcohol and polymerisation in guaiacyl lignin is favored versus hydroxylation and methylation leading to syringyl lignin (see Figure 1). Such a channelling mechanism could be demonstrated by feeding labelled precursors and following label fate in the intermediate pools.

Recently, major advances have been made in the understanding of the phenylpropanoid pathway by analysing the impact of lignin biosynthetic gene repression in antisense plants (Abbott et al., 2002; Atanassova et al., 1995; Baucher et al., 1998; Pinçon et al., 2001a, 2001b) and *Arabidopsis* mutants (Franke et al., 2002a; Humphreys and Chapple, 2002). Depending on the enzyme targeted for repression, different changes in lignin content and/or composition were observed, observations that shed new light on the role of the targeted enzymatic step in the biosynthetic pathway. For example, the strong reduction of S units in the lignin of tobacco transformed with a COMT I transgene demonstrated the function of COMT I in S unit synthesis and implicated CCoAOMT in G unit synthesis (Atanassova et al., 1995, see Figure 1). The role of CCoAOMT has been confirmed by analysis of new antisense plants (Pinçon et al., 2001b). It should be noted that, in most of the aforesaid cases and in others, changes in guaiacyl and/or syringyl unit synthesis were observed, resulting in variations in the S/G ratio but not systematically in detectable changes of lignin content. Nor was H unit content affected, angiosperm lignin being mainly constituted of G and S units. As shown in Figure 1, the conversion of the metabolic precursor of the H unit, *p*-coumaroyl CoA, into caffeoyl CoA (the precursor of both G and S lignin units) is catalysed sequentially by HCT and C3H. Recently it was shown that an *Arabidopsis* mutant (*ref 8*) affected in the C3H gene contained less lignin than wild type plants and its lignin was unusual in being composed primarily of H units (Franke et al., 2002a). The same trends in lignin changes were observed in the HCT-silenced plants, although to a lesser extent, probably because (i) HCT silencing was induced at an advanced stage of development (i.e. after wild type lignin was formed) and (ii) as discussed above, all infected cells were not affected to the same extent. Comparable phenotypes of plants affected in the *C3H* or *HCT* genes are consistent with the fact that the two enzymatic steps are consecutive in the synthesis of caffeoyl CoA from *p*-coumaroyl CoA. Furthermore, the modifications of lignin structure and content decreased cell wall resistance to hydrolytic enzymes of the *Arabidopsis* mutant *ref8* as observed for the HCT-silenced plants described here. These data point to the importance of lignification for cell wall resistance to the action of hydrolytic enzymes such as those produced by pathogenic organisms. The study of the resistance of silenced plants to bacterial and fungal pathogens will enable us to test this hypothesis.

METHODS

Chemicals, enzymes and general methods.

Commonly used chemicals and reagents were of the highest purity readily available. Bradford protein dye reagent was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). Restriction enzymes and buffers were purchased from Biolabs (Beverly, MA) or Gibco BRL (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). T4 DNA ligase, T4 polynucleotide kinase and ATP were purchased from Gibco BRL. Purified oligonucleotides used for cloning and DNA sequencing were provided by Gibco BRL Custom Primers. DNA amplification using *Taq* polymerase (Gibco BRL) was performed in the iCyclerTM thermocycler (Bio-Rad Laboratories). Plasmid and PCR products were extracted and purified from agarose gels using kits purchased from Qiagen (Hilden, Germany).

Plant material and culture conditions

Nicotiana tabacum and *Nicotiana benthamiana* plants were grown in a growth chamber under 3,000 lux lighting and a light/dark cycle of 16h/8h. The temperature was maintained at $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Tissues were harvested from flowering tobacco plants and frozen in liquid nitrogen. One-month old *N. benthamiana* seedlings were infected with TRV constructs using *Agrobacterium*-mediated transient gene expression (Ratcliff et al., 2001)

DNA sequencing.

DNA sequencing was performed by the method of Sanger (Sanger et al., 1977) using the rhodamine dye-terminator cycle ready kit with AmpliTaq DNA polymerase FS (Perkin-Elmer, Foster City, CA) and a Applied Biosystems DNA sequencer (model 373A, Foster City, CA).

Production and use of polyclonal antibodies

Heterologous expression in *E. coli* cells and purification of the HCT protein were carried out as described previously (Hoffmann et al., 2003). Polyclonal antibodies were raised in rabbit by four successive injections of 100 μg of the purified enzyme. Before injection, the protein solution was emulsified with Freund's complete adjuvant for the first injection, and with incomplete adjuvant for the others. The anti-CCoAOMT antibodies were produced as described by Maury et al. (1999). Anti-HCT antibodies were used at 1/10,000 or 1/500 dilution and anti-CCoAOMT serum at 1/2,000 or 1/200 dilution in protein-gel blot and immunohistochemical analyses, respectively. For specificity tests, anti-HCT antibodies were pre-incubated for 2 h at 20°C in phosphate buffer saline solution (PBS) or in PBS containing 100 μM of purified HCT recombinant protein.

Protein gel blot analysis

The basic procedures for electrophoresis of proteins under denaturing conditions and immunoblotting were as described previously (Geoffroy et al., 1990) except that phosphatase activity was detected with a chemiluminescent substrate (BioRad CDP-Star).

DNA gel blotting

Genomic DNA analysis was performed as previously described in (Martz et al., 1998). DNA samples (40 µg) were digested to completion with one or two restriction enzymes, ethanol-precipitated and resolved on 0.8 % agarose gel. Following depurination, the gel was blotted on Hybond N+ membrane (Amersham Bioscience). The [α - 32 P]dCTP-labelled probe was synthesised from the 957 pb *N. benthamiana* HCT fragment by random priming. DNA gel blot hybridisation and washing steps were carried out at 65°C.

HCT activity assays

Plant tissues were ground with a pestle and mortar in liquid nitrogen and the powder was extracted with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, containing 10 mM dithiothreitol, quartz and polyclar AT (Serva, Buchs, Switzerland). After centrifugation at 4°C for 20 min at 13,000 rpm, the supernatant was used for HCT activity measurement in crude extracts. The reaction mixture contained 100 mM phosphate buffer pH 6.6, 1 mM dithiothreitol, 0.4 to 12 µg of protein, 100 µM *p*-coumaroyl CoA and 4 mM shikimate in a total volume of 20 µl. The reaction was initiated by addition of the enzyme extract, incubated at 30°C for 2 to 30 min and terminated by addition of 20 µl of HPLC solvent. Reaction products were analysed and quantified by HPLC. Protein content was measured by the method of Bradford (1976).

Immuno-histochemical analyses

Stems from 8 week old *N. tabacum* were collected, fixed with a solution containing 3.7% formaldehyde, 50% ethanol and 5 % acetic acid in water, dehydrated in an ethanol series, and embedded in paraplast before 10 µm thick sections were made. Stems of 8 week old *N. benthamiana* infected for 4 weeks were hand-sectioned and immediately fixed for 1 h by immersion in ethanol. Before immunolabelling, sections were rehydrated in PBS solution, blocked for 1 h in PBS containing 5 % (w/v) bovine serum albumin (BSA), 5 % (v/v) normal goat serum and 0.1 % cold water fish skin gelatine (Aurion, Wageningen, The Netherlands) and further incubated overnight at 4°C in PBS containing 0.1 % (v/v) acetylated BSA (Aurion). Sections were then washed four times in PBS and incubated again in the dark for 4 h at room temperature with Alexa-fluor 568 goat anti-rabbit immunoglobulin G (Alexa 568, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) diluted 1:300 in PBS plus 0.1 % acetylated BSA. Samples were washed again four times before light microscopical observations. Control

experiments in which primary antibodies were omitted were routinely performed to verify the specificity of the labelling.

Epifluorescence microscopy

Epifluorescence microscopy observations were done with a Nikon Eclipse E800 microscope with appropriate filters and a X10 0.3 numerical aperture objective. For Alexa 568, the parameters were as follows: excitation wavelength (ex), 515 to 565 nm; dichroic mirror (dm), 565 nm; and emission band pass filter, 582.5 to 627.5 nm. For lignin autofluorescence, the parameters were as follows: ex, 330 to 380 nm; dm, 400 nm; and emission long-pass filter, 420 nm. Image acquisition was performed as previously described (Gaire et al., 1999).

Confocal laser scanning microscopy

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was performed with a Zeiss (Jena, Germany) LSM510 microscope equipped with a Zeiss Axiovert 100M inverted microscope and a X10, 0.3 numerical aperture objective. Laser scanning was performed using the multi-track mode to avoid bleed-through. Excitation/emission wavelengths were 488/505-545 nm for lignin and 543/560-615 nm for Alexa 568. Image processing used LSM510 version 2.8 (Zeiss) and PhotoShop 5.5 (Adobe Systems, San Jose, CA) for final assembly.

Cloning of a partial HCT cDNA from *N. benthamiana*

Reverse transcription. Reverse transcription with total RNA from one month old *N. benthamiana* stems was carried out using (poly)dT primer and SuperscriptTM (Life technologies) according to the manufacturer's instructions.

Generation of partial cDNAs. Partial cDNAs were produced by PCR using as template the cDNA generated by reverse transcription. The sense degenerate oligonucleotide primer (5'-TTTTAYCCNATGGCKGGKMG-3') was based on the consensus sequence FYPMAG conserved between *N. tabacum* HCT and other acyltransferases (Hoffmann et al., 2003). The antisense primer was based upon the conserved region DFGWG near the carboxyl terminus of acyltransferase proteins and had the following sequence : 5'-CCCCAICCRAARTC-3'. I indicates inosine and R, H, Y, K, M and N indicate the following degenerate sites: R, A/G; H, A/C/T; Y, C/T; K, G/T; M, A/C and N, A/G/C/T. DNA amplification was performed under the following conditions: 3 min at 94°C and then 35 cycles at 94°C for 1 min, 42°C for 1 min and 72°C for 1 min. At the end of the 35 cycles, the reaction mixture was incubated for an additional 10 min at 72°C. The amplified DNA was resolved by agarose gel electrophoresis, and the band of the correct size (957 bp) was isolated and subcloned into pCRII-TOPO (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) prior to sequencing.

VIGS technology

Virus Induced Gene Silencing (VIGS) technology was used to induce HCT gene silencing in *N. benthamiana* with the tobacco rattle virus vector system (Ratcliff et al., 2001). The 957 bp cDNA fragment of the *N. benthamiana* HCT gene was cloned into the *Apa*I and *Bam*HI sites of pTV00 vector to produce the pTV-HCT construct used for *N. benthamiana* infection.

Lignin analysis

Wiesner and Maüle staining were performed as previously described (Atanassova et al., 1995). Lignin analysis was carried out on the stems of 3 month-old *N. benthamiana* plants which had been infiltrated 8 weeks before collection. The air-dried stems were evenly ground to pass through a 0.5 mm sieve before an exhaustive solvent extraction, first with toluene:ethanol (2:1, v/v), then with ethanol, and finally with water. The lignin content was determined from the freeze-dried extract-free samples by the standard Klason method (Dence, 1992). The Klason lignin content was calculated in weight percent of the dry extract-free stem material and from 4 replicate analyses performed on 300 mg of sample. Thioacidolysis reagent was prepared by introducing 2.5 ml BF₃ etherate (Sigma-Aldrich, Saint Quentin, France) and 10 ml of ethanethiol EtSH (Sigma-Aldrich) into a 100-ml flask and adjusting the final volume to 100 ml with dioxane. The colourless reagent was used immediately after preparation. The extract-free stem samples (20 mg) were added to 10 ml of reagent and 1 ml of solution of GC internal standard (docosane, 0.24 mg/ml in CH₂Cl₂) in a glass tube closed with a Teflon-lined screwcap. Thioacidolysis was performed at 100°C in an oil bath for 4 h. The cooled reaction mixture was diluted with 30 ml water and the pH was adjusted to 3-4 with 0.4M NaHCO₃. The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 30 ml). Combined organic extracts were dried over Na₂SO₄ and then evaporated under reduced pressure at 40°C. The final residue was redissolved in ca. 0.5 ml CH₂Cl₂ before silylation and GC-MS analyses according to (Lapierre, 1986). Quantitation of the main *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) and syringyl (S) lignin-derived monomers, analysed as their trimethylsilylated derivatives, was carried out from specific ion chromatograms reconstructed at *m/z* 239 for the H monomers, 269 for G monomers and at *m/z* 299 for S monomers after an appropriate calibration relative to the docosane internal standard.

Cell wall degradability

The susceptibility to cellulolysis was evaluated using a method adapted from (Rexen, 1977): 200 mg of the extract-free ground sample were placed in 30 ml of 0.05 M sodium acetate buffer pH 4.5, containing 2 mg/ml commercial cellulase (cellulase Onozuka-R10, Serva, Heidelberg, Germany). The cellulolysis was carried out for 48 h at 37°C with magnetic stirring. After incubation, the reaction medium was filtrated over a tared filtering crucible, the residue was washed with water, oven-dried and then gravimetrically determined.

HPLC analysis of reaction products

Incubation products were resolved on a RP C18 column (Novapak, 4 μ m, 4.6 x 250 mm, Waters, USA) using an increasing gradient of acetonitrile in water containing 0.1% formic acid. Gradient conditions at 1 ml/min flow rate were as follows: 10 to 50 % acetonitrile for 50 min; 50 to 80 % acetonitrile for 5 min; 80 to 10 % for 5 min and then 10 min reequilibration with 10 % acetonitrile. Compounds were characterised by their retention time and their UV absorption spectrum recorded with a photodiode array detector (Waters, USA). The amounts of hydroxycinnamoyl shikimate esters were determined using authentic standards (Hoffmann et al., 2003).

Synthesis and purification of the *p*-coumaroyl-CoA substrate

p-coumaroyl-CoA ester was prepared according to the method of Stöckigt and Zenk with some modifications (Negrel and Smith, 1984; Stöckigt and Zenk, 1975) and identified and quantified by spectroscopy.

Accession numbers

The GenBank accession numbers for the sequences mentioned in this article are AJ507825 for *N. tabacum* HCT cDNA and AJ555865 for *N. benthamiana* partial HCT cDNA. Upon request, all novel materials described in this article will be made available in a timely manner for non-commercial research purposes.

Acknowledgements

We wish to thank Robert Erb, Drs Jérôme Mutterer and Matthieu Erhardt for assistance with microscopy, Frédéric Legée (INRA Grignon) for the Klason lignin determinations, Dr Phil Mullineau (John Innes Centre, Norwich) for pSoup plasmid, Dr D. Baulcombe for VIGS vectors. The assistance of Ms Laurette De Franco is gratefully acknowledged. We are grateful to Drs Kenneth Richards and Olivier Voinnet for critical reading. The Zeiss LSM510 confocal microscope was co-financed by the CNRS, the Université Louis Pasteur, the Région Alsace, the Association de la Recherche sur le Cancer and the Ligue Nationale contre le Cancer.

REFERENCES

- Abbott, J. C., Barakate, A., Pinçon, G., Legrand, M., Lapierre, C., Mila, I., Schuch, W., and Halpin, C.** (2002) Simultaneous suppression of multiple genes by single transgenes. Down-regulation of three unrelated lignin biosynthetic genes in tobacco. *Plant Physiol.* **128**, 844-853.
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Thollier, M. T., Monties, B., Fritig, B., and Legrand, M.** (1995) Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J.* **8**, 465-477.
- Bandoniene, D., and Murkovic, M.** (2002) On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2482-2487.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M. and Boerjan, W.** (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 125-197.
- Boveris, A., Valdes, L., and Alvares, S.** (2002) Inhibition by wine polyphenols of peroxynitrite-initiated chemiluminescence and NADH oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 90-102.
- Burns, J., Gardner, P., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M., Lean, M., Duthie, G., and Crozier, A.** (2000) Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity and phenolic content of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 220-230.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., and Lewis, N. G.** (2000) Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and molecular biology of plants* (B. B. Buchanan, W. Gruissem, & R. L. Jones, Eds.). Rockville: American society of plant physiologists, pp. 1250-1318.
- Dence, C.** (1992) *The determination of lignin*. Berlin: Springer-Verlag.
- Dixon, R. A., and Ferreira, D.** (2002) Molecules of interest. Genistein. *Phytochemistry* **60**, 205-211.
- Franke, R., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Humphreys, J. M., and Chapple, C.** (2002a) Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* **30**, 47-59.
- Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., and Chapple, C.** (2002b) The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **30**, 33-45.
- Gaire, F., Schmitt, A. C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L., and Ritzenthaler, C.** (1999) Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* **264**, 25-36.
- Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B.** (1990) Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**, 327-333.

Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M. (2003) Purification, cloning and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**, 95-103.

Humphreys, J. M., and Chapple, C. (2002) Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 224-229.

Inoue, K., Sewalt, V. J. H., Ballance, G. M., Ni, W., Stürtzer, C., and Dixon, R. A. (1998) Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl-Coenzyme A 3-*O*-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiol.* **117**, 761-770.

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

Kahkonen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T., and Heinonen, M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3954-3962.

Lange, B. M., Lapierre, C., and Sandermann, H., Jr. (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin. Structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiol.* **108**, 1277-1287.

Lapierre, C. (1986) Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. *Holzforschung* **40**, 113-118.

Lekse, J. M., Xia, L., Stark, J., Morrow, J. D., and May, J. M. (2001) Plant catechols prevent lipid peroxidation in human plasma and erythrocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **226**, 89-95.

Lewis, N. G. (1999) A 20th century roller coaster ride: a short account of lignification. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 153-162.

Martz, F., Maury, S., Pinçon, G., and Legrand, M. (1998) cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. *Plant Mol. Biol.* **36**, 427-437.

Maury, S., Geoffroy, P., and Legrand, M. (1999) Tobacco *O*-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism: the different CCoAOMT and COMT classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiol.* **121**, 215-224.

Negrel, J., and Smith, T. A. (1984) The phosphohydrolysis of hydroxycinnamoyl-CoA thioesters in plant extracts. *Phytochemistry* **23**, 31-34.

Olthof, M. R., Hollman, P. C., and Katan, M. B. (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **131**, 66-71.

Pinçon, G., Chabannes, M., Lapierre, C., Pollet, B., Ruel, K., Joseleau, J.-P., Boudet, A. M., and Legrand, M. (2001a) Simultaneous down-regulation of caffeic/5-hydroxyferulic acid-*O*-methyltransferase I and cinnamoyl-coA reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene. Consequences for plant development and lignin synthesis. *Plant Physiol.* **126**, 145-155.

- Pinçon, G., Maury, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M.** (2001b) Repression of *O*-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* **57**, 1167-1176.
- Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M., and Baulcombe, D. C.** (2001) Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* **25**, 237-245.
- Rexen, B.** (1977) Enzyme solubility- a method for evaluating the digestibility of alkali-treated straw. *Animal Feed Sci. Technol.* **2**, 205-218.
- Ruel, K., Chabannes, M., Boudet, A. M., Legrand, M., and Joseleau J. P.** (2001) Reassessment of qualitative changes in lignification of transgenic tobacco plants and their impact on cell wall assembly. *Phytochemistry* **57**, 875-882.
- Ruiz, R. T., Voinnet, O., and Baulcombe, D. C.** (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937-946.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schoch, G., Goepfer, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., and Werck-Reichhart** (2001) CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 36566-36574.
- St-Pierre, B., and De Luca, V.** (2000) Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferase involved in secondary metabolism. *Recent Adv. Phytochem.* **34**, 285-315.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A., and De Luca, V.** (1998) The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.* **14**, 703-713.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P. E., Hussain, E. A., Damayanti-Wood, B. I., and Farnsworth, N. R.** (2001) Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **41**, 251-286.
- Stöckigt, J., and Zenk, M. H.** (1975) Chemical synthesis and properties of hydroxycinnamoyl-CoA derivatives. *Z. Naturforsch* **30c**, 352-358.
- Voinnet, O., and Baulcombe, D. C.** (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553.
- Ye, Z.-H.** (1997) Association of caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants. *Plant Physiol.* **115**, 1341-1350.


```

Tabacum      TTGTGAATTCATTT CAGGGAATTTGAACCGTTGATCAAC GATGAAGATC GAGGTGAAAAGA 60
Benthamiana -----

Tabacum      ATCGACGATGGTAAAGCCGGCGGCGGAGACGCCACAACA GAGGCTGTGGAACTCTAATGT 120
Benthamiana -----

Tabacum      GGATTTGGTGGTGC CGAATTTCCACACGCC CAAGTGTTTATTTTACAGGCCGACGGGATC 180
Benthamiana -----

Tabacum      CCCAAATTTCTTCGACGGAAAAGT GCTGAAGGAAGCTCTAAGCAAAGCACTTGTGCCGTT 240
Benthamiana -----TT 2
                      **

Tabacum      TTATCCTATGGCGGGGAGGCTGTGTAGGGACGAAAGATGGTCTGATTGAGATTGACTGTAA 300
Benthamiana TTACCCTATGGCTGGTCCGACTGTGTAGGGACGAAAGATGGTCTGATTGAAATGACTGTAA 62
                      *** ***** ** * *****

Tabacum      AGGTCAAGGGGGTGTCTTTTGTGGAAGCTGAGTCCGGATGGTGTGGTGGATGATTTTGGTGA 360
Benthamiana AGGTCAAGGGGGTGTCTTTTGTGGAAGCTGAGTCCGGATGGTGTGGTGGATGATTTTGGTGA 122
                      *****

Tabacum      TTTTCCCCCAGCTTAGAACTCCGTCACATCATCCCCGCGTTGATTACTACAAGGAAT 420
Benthamiana TTTTGGCGCCAGCTTGGAACTCCGTCACATCATCCCCGCGTTGATTACTACAAGGAAT 182
                      *****

Tabacum      TCAATCGTATGCTCTCTTAGTGTTCAGATAAACAATTTTAAATGTGGGGGAGTTTCCCT 480
Benthamiana TCAATCGTATGCTCTCTTAGTGTTCAGATAAACAATTTTAAATGTGGGGGAGTTTCCCT 242
                      *****

Tabacum      TGGTGTGGGCATGCAACATCATGCAGCAGATGGAGCTTCTGGTCTTTCATTCATCAACAC 540
Benthamiana TGGTGTGGGCATGCAACATCATGCAGCAGATGGAGCTTCTGGTCTTTCATTCATCAACAC 302
                      *****

Tabacum      ATGGTCTGATATGGCTCGTGGTCTGGACCTCACCATCCCACCTTTCAITGACCGGACCCT 600
Benthamiana ATGGTCCGATATGGCTCGTGGTCTGGACCTCACCATCCCACCTTTTATAGACCGGACCCT 362
                      *****

Tabacum      CCTCGTGTCTGGTATCCACTCAGCCTCAGTTTCCCATGTGAGTAC CAGCCACCTCC 660
Benthamiana CCTCGTGTCTGGTATCCACTCAGCCTCAGTTTCCCATGTGAGTAC CAGCCACCTCC 422
                      *****

Tabacum      CACTCTCAAGGTAACCTCCAGAAAACACCCCTATATCTGAAGCTGTTCTTCAAAC CAGCGT 720
Benthamiana CACTCTCAAGGTAACCTCCGAAAACACCAACCAACTGAAATTTGTTCTTCAAAC CAGCGT 482
                      *****

Tabacum      GTCCATCTTCAAATTAACCCTGTATCAAATCAATACCCTCAAAGCCAAGTCCAAAGGAAGA 780
Benthamiana GTCCATCTTCAAATTAACCCTGTATCAAATCAATACCCTCAAAGCCAAGTCCAAAGGAAGA 542
                      *****

Tabacum      TGGAAATACCGTTAACTACAGCTCTACGAGATGTTGGCAGGACATGTGTGGCGCTCCAC 840
Benthamiana TGGAAATACCGTTAACTACAGCTCTACGAGATGTTGGCAGGACATGTGTGGCGCTCCAC 602
                      *****

Tabacum      GTGCATGGCACGAGGACTCGCTCATGATCAAGAAACCAAATTTGTACATAGCAACAGATGG 900
Benthamiana GTGCATGGCACGAGGACTCGCTCATGATCAAGAAACCAAATTTGTACATAGCAACAGATGG 662
                      *****

Tabacum      ACGTTCAGGCTTCGGCCCTCTCTCCCACAGGCTATTTTCGGTAATGTGATATTACTAC 960
Benthamiana ACGTTCAGGCTTCGACCCCTCTCTCCCACAGGCTATTTTCGGTAATGTGATATTACTAC 722
                      *****

Tabacum      CACTCCTATTGCACTGCGAAGGTGATATCCAATCGAAGCCTATTTGGTATGCTGC CAGTAA 1020
Benthamiana TACTCCTATTGCACTGCGCTGATATCCAATCAAAGCCTATTTGGTATGCTGC CAGTAA 782
                      *****

Tabacum      ATTAATGATGCATTTGGCTAGAATGGACAACGATTACTTTAAGATCAGCTCTTGATTATTT 1080
Benthamiana ATTAATGATGCATTTGGCTAGAATGGACAATGACTATTTAAGATCAGCTCTTGATTATTT 842
                      *****

Tabacum      GGAGTTGCAAGCTGACTTAAAGGCTCTTGTTCGTGGTGCACATACGTTTAAAGTGGCCGAA 1140
Benthamiana GGAGTTGCAAGCTGACTTAAAGGCTCTTGTTCGTGGTGCACATACATTTAAAGTGGCCGAA 902
                      *****

Tabacum      TTTAAGAAATAACTAGTTGGTCTAGGCTGC CAATCATGATGCTGATTTGGCTGGGTAG 1200
Benthamiana TTTAAGAAATAACTAGTTGGTCTAGGCTGC CAATCATGATGCTGATTTGGCTGGGTAG 957
                      *****

Tabacum      GCCTATATTTATGGGACCTGGTGGTATTGCTTATGAAGGTTTAAAGCTTTATATTGCCAAG 1260
Benthamiana -----

Tabacum      TCCTACAAATGATGGCAGTCAATCTGTTGCAATCTCTTACAAGCAGAACACATGAAACT 1320
Benthamiana -----

Tabacum      TTTCGAGAAATCTTGTGATGACTTTTGAAGAAAACCAAATCTTTGTGCTGCTTCTTTTGG 1380
Benthamiana -----

Tabacum      GGTTTATATTGATGATATGTAAGAACTCCCTTTATTTTTCATTGGAGGCTGTCTTTT 1440
Benthamiana -----

Tabacum      CTTCCTCTTTTTTCTCAGTGAACCTCGGTCATATTCATAATAGACATCAGTTCTTATT 1500
Benthamiana -----

Tabacum      TCTGCTT 1507
Benthamiana -----

```

Figure 1 17. Alignement des séquences nucléotidiques entre l'ADNc du gène *HCT* de *N. tabacum* (numéro d'accèsion, AJ507825) et le fragment partiel d'ADNc cloné chez *N. benthamiana* (numéro d'accèsion, AJ555865). Les flèches indiquent la position des oligonucléotides dégénérés employés pour le clonage (article 2). (*) représente les nucléotides identiques entre les deux séquences.

—: site de restriction *EcoRI* unique.

```

Tabacum      MKIEVKESTMVKPAAETPQQRLLWNSNVDLVVFNHHTPSVYFYRPTGSENFDFGKVLKEAL 60
Benthamiana  -----

Tabacum      SKALVFFYPMAGRLCRDEDGRIEIDCKGQGVLFVEAESDGVVDDFGDFAPTLELRQLIPA 120
Benthamiana  -----FYPMAGRLCRDEDGRIEIDCKGQGVLFVEAESDGVVDDFGDFAPTLELRQLIPA 54
                *****

Tabacum      VDYSQGIQSYALLVLQITHFKCGGVS LGVGMQHHAADGASGLHFINTWSDMARGLDLTI P 180
Benthamiana  VDYSQGIQSYALLVLQITHFKCGGVS LGVGMQHHAADGASGLHFINTWSDMARGLDLTI P 114
                *****

Tabacum      PFIDRTLRLRARDPPQPQFPHVEYQPPPTLKVT PENTPISEAVPETSVSIFKLRDQINTL 240
Benthamiana  PFIDRTLRLRARDPPQPQFPHVEYQPPPTLKVT PENTTNPEIVPETSVSIFKLRDQINTL 174
                ***** * *****

Tabacum      KAKSKEDGNTVNSYEMLAGHVWRSTCMARGLAHDQETKLYIATDGRSRLRPSLPPGYF 300
Benthamiana  KAKSKEDGNTVNSYEMLAGHVWRSTCMARGLAHDQETKLYIATDGRSRLRPSLPPGYF 234
                *****

Tabacum      GNVIFTTTPIAVAGDIQSKPIWYAASKLHDALARMDNDYLRSALDYLELQPDLKALVRGA 360
Benthamiana  GNVIFTTTPIAVAGDIQSKPIWYAASKLHDALARMDNDYLRSALDYLELQPDLKALVRGA 294
                *****

Tabacum      HTFKCENLGITSWSRLEPIHDADFGWGRPIFMGPGGIAYEGLSFILPSP TNDGSQSVAISL 420
Benthamiana  HTFKCENLGITSWSRLEPIHDADFGW----- 319
                *****

Tabacum      QAEHMKLFEKFLYDF 435
Benthamiana  -----

```

Figure I 18. Alignement des séquences protéiques entre l'acyltransférase de *N. tabacum* (HCT; numéro d'accèsion, CAD47830) et le peptide correspondant à l'ADNc partiel cloné chez *N. benthamiana* (numéro d'accèsion, AJ555865). (*) représente les acides aminés identiques entre les deux séquences.

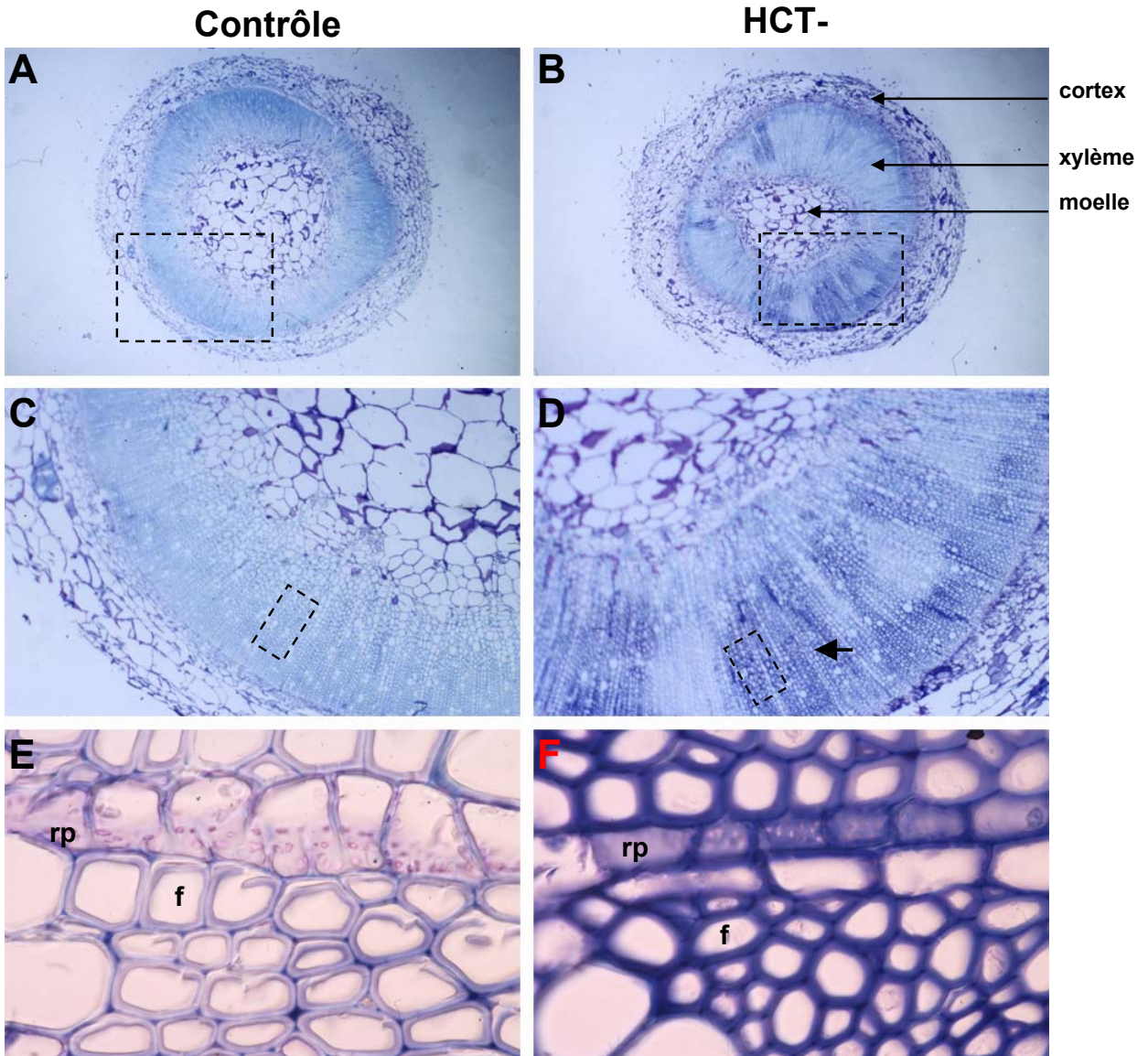


Figure I 19. Analyse histologique, au bleu de toluidine, de coupes transversales de tiges de *N. benthamiana* contrôles ou réprimées pour le gène *HCT* (*HCT-*).

A, C, E : coupes transversales de tiges contrôles observées à différents grossissements; **A**, x1,4; **C**, x5,2; **E**, x50.

B, D, F : coupes transversales de tiges *HCT-*. Grossissement : **B**, x1,4; **D**, x5,4; **F**, x50.

Les clichés C et D représentent un zoom sur les encarts en pointillés des photos A et B.

Les clichés E et F représentent un zoom sur les encarts en pointillés des photos C et D.

rp : cellules du parenchyme bordant les fibres du xylème.

f : fibres du xylème.

3. Résultats complémentaires

3.1 Clonage d'un fragment d'ADNc du gène codant pour HCT chez *N. benthamiana*

Dans le cadre des expériences de répression du gène *HCT* par l'approche « VIGS », nous avons isolé et cloné un fragment d'ADNc (957 pb) du gène codant pour HCT chez *N. benthamiana* (voir article 2). Ce fragment présente plus de 95% d'identité avec l'ADNc de *N. tabacum* (**Fig. I 17**) et au niveau protéique, les deux séquences présentent près de 99% d'identité (**Fig. I 18**). L'expérience de *Southern blot* présentée dans l'article 2 nous permet de conclure qu'il n'y a qu'un seul représentant du gène *HCT* chez *N. benthamiana*.

3.2 Analyse histologique des tissus conducteurs de plants de *N. benthamiana* dont le gène *HCT* est réprimé

L'inhibition de l'expression du gène *HCT* chez *N. benthamiana* (HCT-) conduit à une modification chimique de la lignine synthétisée au niveau des tissus conducteurs. Cette altération est mise en évidence par l'apparition de zones blanches après coloration de coupes transversales de tiges HCT- avec le réactif de Mäule, qui révèle spécifiquement les unités monomériques diméthoxylées (S) (figure 9, article 2). Cette observation a été confirmée par l'analyse chimique de la lignine, puisque ces plantes incorporent moins d'unités S et ceci au profit des unités non méthoxylées (H) (tableau 1, article 2). De plus, les observations microscopiques réalisées sur des coupes transversales de tige HCT- ont révélé que certaines parties des tissus conducteurs présentaient une fluorescence accrue, celles-ci correspondant aux zones blanches après coloration par le réactif de Mäule. La modification du spectre d'émission des tissus lignifiés pourrait provenir de l'incorporation en quantité substantielle d'unités H.

Afin de préciser ces données, nous avons procédé à une analyse histologique de ces tissus à l'aide du bleu de toluidine (**Fig. I 19**). Le bleu de toluidine est un colorant non spécifique qui a la particularité de colorer toutes les structures basophiles avec une intensité qui varie selon leur concentration. Il colore notamment les polyphénols (lignine, tanins) et est donc indiqué pour caractériser les différents tissus vasculaires (voir Matériel et Méthodes).

L'étude de coupes transversales de tige contrôle (plante infectée par la construction TRV-GFP) (**Fig. I 19A et C**) permet de révéler l'anneau vasculaire (xylème) en vert-turquoise caractéristique. Par contre, la coloration des tissus conducteurs de tige HCT- n'est pas homogène (**Fig. I 19B et D**). On retrouve la coloration vert-turquoise des tissus témoins mais avec des zones présentant une coloration bleue plus intense (flèche, **Fig. I 19D**). Ce changement de coloration reflète une modification de la composition chimique de ces pages. La corrélation entre ces zones plus intenses révélées au bleu de toluidine et celles apparaissant

en blanc lors de la coloration de Mäule ou plus fluorescentes en microscopie reste à démontrer. Lorsque l'on « zoome » sur l'anneau vasculaire de plante contrôle (**Fig. I 19E**), ou sur les zones plus intenses des tissus HCT- (**Fig. I 19F**), on visualise distinctement les fibres du xylème (f) et les cellules parenchymateuses (rp). Les parois cellulaires lignifiées des fibres HCT- présentent une coloration plus intense que celle des fibres contrôle et paraissent plus épaisses. De plus, on constate que le contenu cytoplasmique des cellules du parenchyme HCT- apparaît également nettement plus foncé que celui des cellules témoins. Ce type d'observation avait déjà été réalisé chez des peupliers transgéniques réprimés pour l'expression d'un gène codant pour une laccase (Ranocha *et al.*, 2002). Ces plantes accumulaient jusqu'à trois fois plus de composés phénoliques solubles. Les auteurs ont conclu, en s'appuyant sur l'augmentation de l'intensité de la coloration au bleu de toluidine, que ces composés phénoliques s'accumulaient préférentiellement au niveau des cellules parenchymateuses du xylème. Dans notre cas, l'augmentation de l'intensité de la coloration bleue pourrait également être corrélée avec l'accumulation d'intermédiaires métaboliques et notamment de l'acide chlorogénique (voir paragraphe suivant).

Les clichés présentés **Fig. I 19E** et **F** indiquent une modification de l'aspect et de l'organisation des fibres du xylème. Contrairement aux cellules contrôle, de forme plutôt rectangulaire et disposées en faisceau, les fibres de plantes HCT- sont plus rondes, plus petites et sont disposées sans agencement particulier. Cet effet de l'inhibition de l'expression d'HCT sur la structure et l'organisation des tissus conducteurs a été observé lors de la répression d'autres gènes impliqués dans la biosynthèse de la lignine (voir paragraphe 2.5.).

3.3 Analyse par CLHP de la teneur en composés phénoliques solubles de tige et de feuilles de plants de *N. benthamiana* dont le gène *HCT* est réprimé

Comme nous venons de le voir (article 2), la répression de l'expression de l'enzyme HCT par une approche « VIGS » a des répercussions importantes sur le développement des plantes et le processus de lignification des tissus conducteurs de la tige et des racines. Ces résultats permettent de considérer la réaction enzymatique catalysée par cette protéine comme une étape clef du métabolisme des phénylpropanoïdes. En plus de sa capacité à fournir les substrats de la C3H (**Fig. I 7**), l'enzyme HCT se montre également capable d'utiliser les produits de la C3H, les esters quinique ou shikimique d'acide caféique, pour synthétiser le caféoyl-CoA (**Fig. I 8**) (article 1). Parmi ces esters d'acide caféique, l'acide chlorogénique (CGA) constitue le composé phénolique soluble le plus abondant chez certaines espèces végétales, dont les Nicotianées (paragraphe 1.2.3.). Il nous a donc semblé intéressant de déterminer quelles étaient les répercussions de la répression d'HCT sur les pools de CGA. Pour cela nous avons séparé par CLHP l'ensemble des composés phénoliques solubles

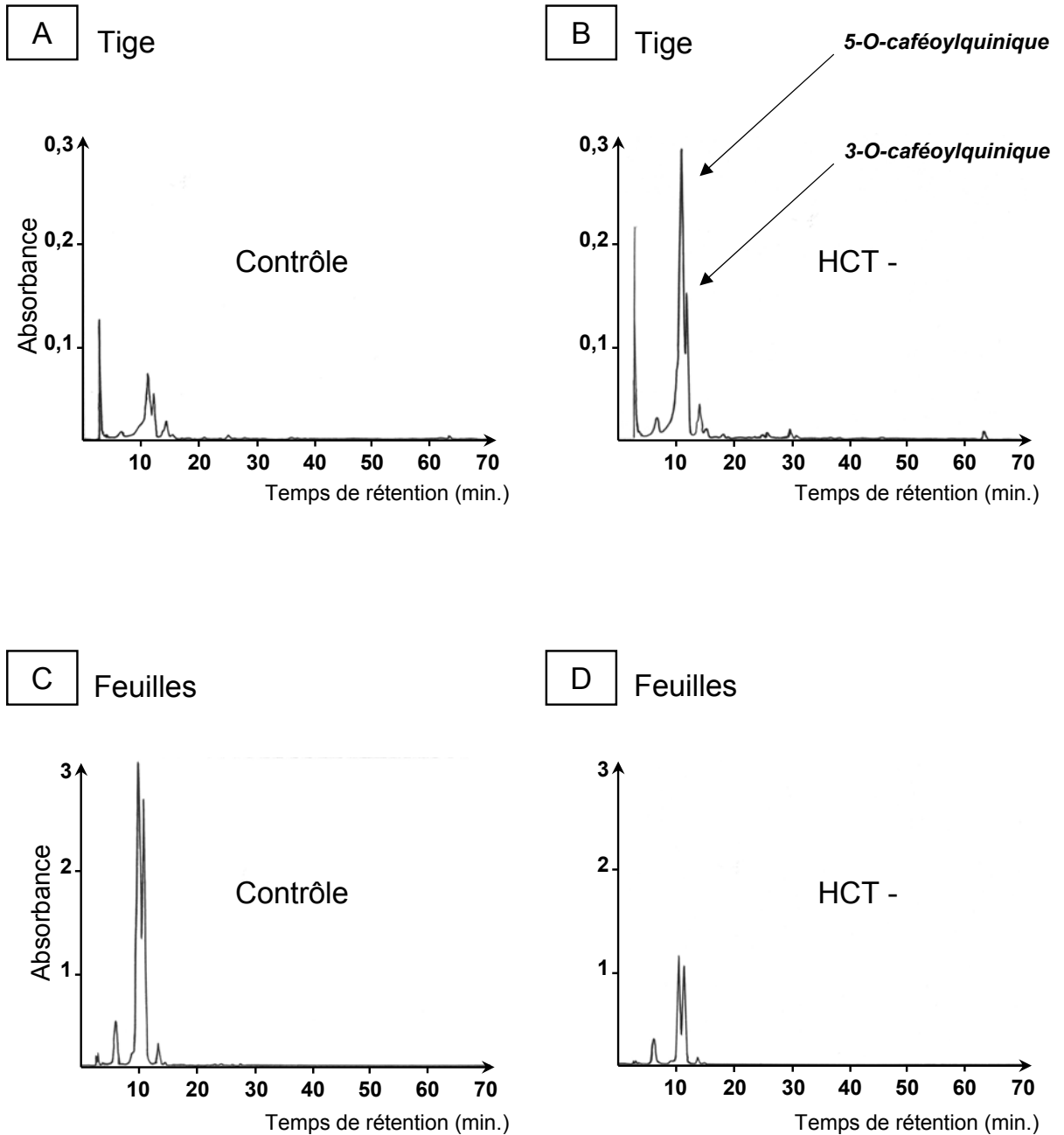


Figure I 20. Analyses par CLHP des phénols solubles extraits de tige et de feuilles de *N. benthamiana* témoin ou HCT- : exemples de chromatogrammes représentant l'absorbance des produits à 320 nm en fonction de leur temps de rétention.

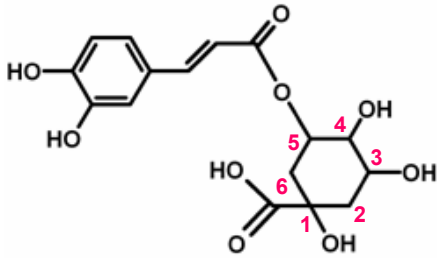
A : séparation des phénols solubles de **tige** de plantes témoin.

B : séparation des phénols solubles de **tige** de plantes HCT-.

C : séparation des phénols solubles de **feuilles** de plantes témoin.

D : séparation des phénols solubles de **feuilles** de plantes HCT-.

A



B

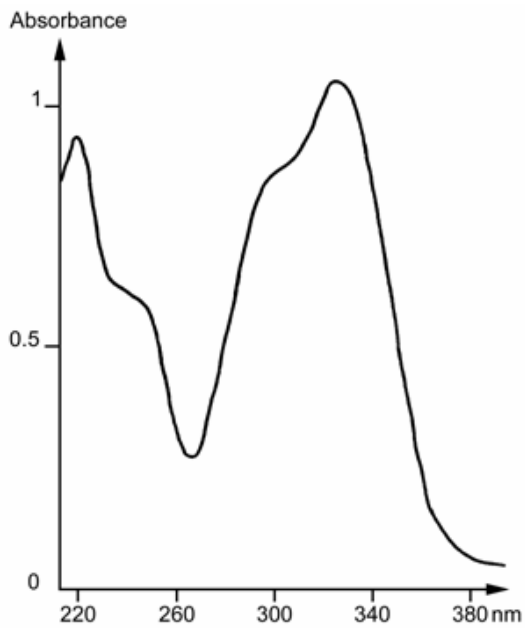
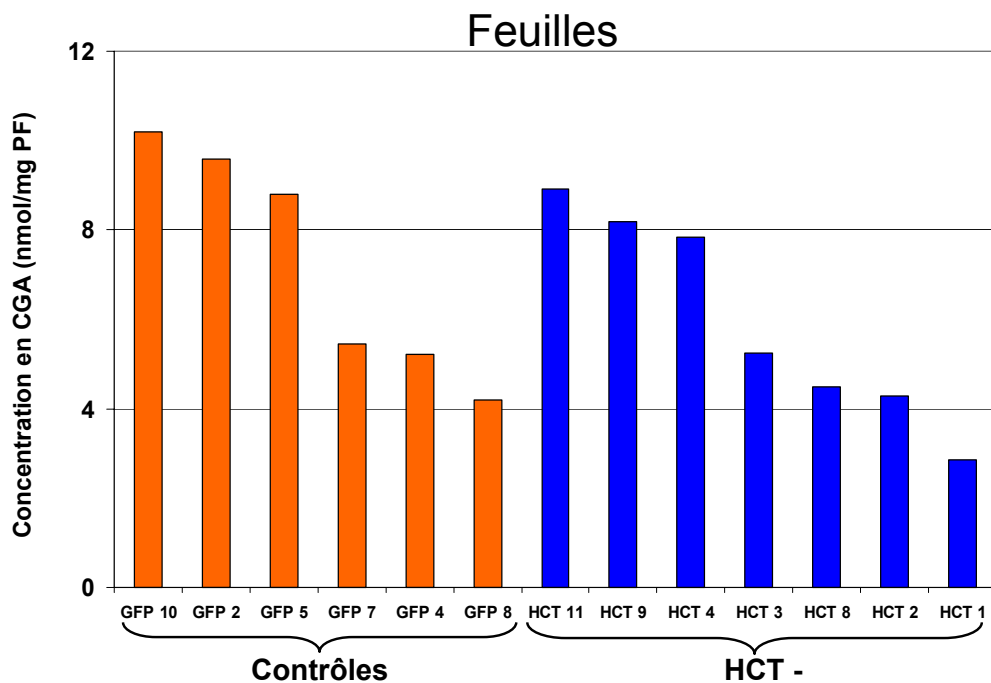


Figure I 21. L'acide chlorogénique.

A : formule chimique et numérotation des carbones du cycle de l'acide quinique.

B : spectre d'absorption.

A



B

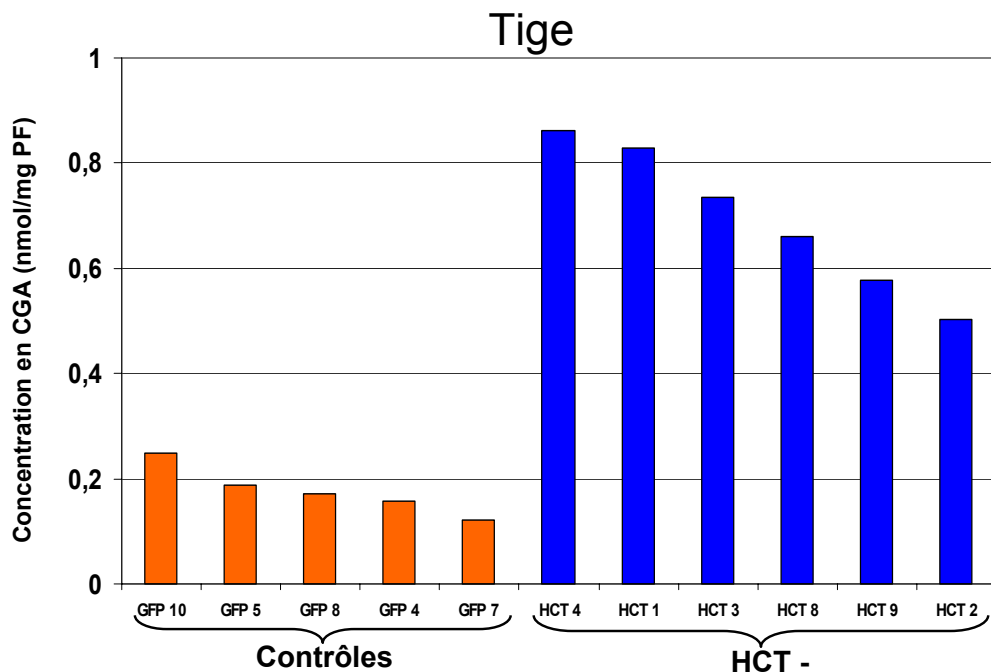


Figure I 22. Analyses par CLHP de la concentration en acide chlorogénique (CGA) de plants de *N. benthamiana* témoin ou HCT- : exploitation des profils CLHP bruts (exemples présentés Fig. I 20) obtenus pour chacune des plantes analysées.

A : histogrammes présentant, dans les feuilles, la concentration d'acide chlorogénique en nmol par mg de poids frais (PF), pour six plantes témoin et sept plantes HCT-.

B : histogrammes présentant, dans la tige, la concentration d'acide chlorogénique en nmol par mg de poids frais (PF), pour cinq plantes témoin et six plantes HCT- .

présents dans les feuilles et les tiges de plantes témoins et réprimées (HCT-) (voir Matériel et Méthodes).

La chromatographie liquide haute performance permet de séparer des composés en fonction de leur hydrophobicité. Après passage sur la colonne, les composés phénoliques sont caractérisés par leur temps de rétention sur la colonne et leur spectre d'absorption dans l'U.V. Ces deux paramètres sont présentés **Fig. I 20** par quatre exemples de chromatogrammes obtenus à partir d'extraits de tige et de feuilles de plantes témoin (**Fig. I 20A et C**) et HCT - (**Fig. I 20B et D**).

Les résultats obtenus pour la tige et les feuilles révèlent, à l'échelle de D.O. choisie, un double pic caractéristique, majoritaire dans les deux tissus. Ce double pic a été identifié comme étant l'acide chlorogénique et l'un de ses isomères, grâce au temps de rétention d'environ 10 min et à un spectre d'absorption identique à celui de composés standards (**Fig. I 21**). Il existe plusieurs esters caféoylquiniques suivant la fonction alcool (1, 3, 4, ou 5) de l'acide quinique engagé dans la liaison ester. Le double pic révèle les deux isomères majoritaires chez le tabac, les isomères 5 et 3.

Les profils bruts de CLHP (**Fig. I 20**) mettent en valeur l'abondance du CGA dans ces tissus par rapport aux autres composés phénoliques et expliquent le rôle de « composé phénolique de réserve » qui lui est attribué. Nous avons néanmoins examiné d'autres pics en utilisant des échelles différentes, sans trouver de différences significatives entre les profils des plantes témoins et des plantes réprimées HCT-. Par contre, les quatre exemples présentés **Fig. I 20** révèlent que la quantité en CGA varie fortement entre les plantes témoin et HCT- et d'un tissu à l'autre. En ce qui concerne la tige (**Fig. I 20A et B**), on constate que la surface des pics correspondant à l'acide chlorogénique est beaucoup plus importante chez la plante HCT- que chez le témoin. Les chromatogrammes présentés **Fig. I 20C et D** montrent le phénomène inverse dans les feuilles : il y a moins d'acide chlorogénique dans les feuilles de la plante HCT- que dans celles du témoin. On verra un peu plus loin que les quantités de caféoylquiniques sont très fluctuantes et qu'on ne peut pas tirer de conclusion de cette expérience particulière. Si l'on compare les chromatogrammes **Fig. I 20A et C**, on constate également que naturellement les feuilles contiennent nettement plus d'acide chlorogénique que la tige. Ces analyses ont été réalisées sur une population de plantes témoin et sur une population de plantes réprimées pour le gène *HCT* afin de confirmer les résultats.

Pour les feuilles, 6 échantillons de plantes témoin infectées avec la construction virale TRV-GFP (GFP10, GFP2, GFP5, GFP7, GFP4 et GFP8) et 7 échantillons de plantes HCT- (HCT11, HCT9, HCT4, HCT3, HCT8, HCT2 et HCT1) ont été analysés (**Fig. I 22A**). Pour la tige, nous avons étudié 5 échantillons de plantes témoin (GFP10, GFP5, GFP8, GFP4 et GFP7) et 6 échantillons de plantes HCT- (HCT4, HCT1, HCT3, HCT8, HCT9 et HCT2) (**Fig. I 22B**). Les quantités d'esters caféoylquiniques pour chaque échantillon sont présentées sous

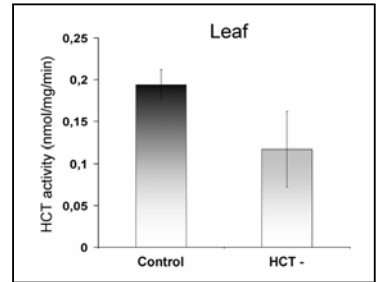
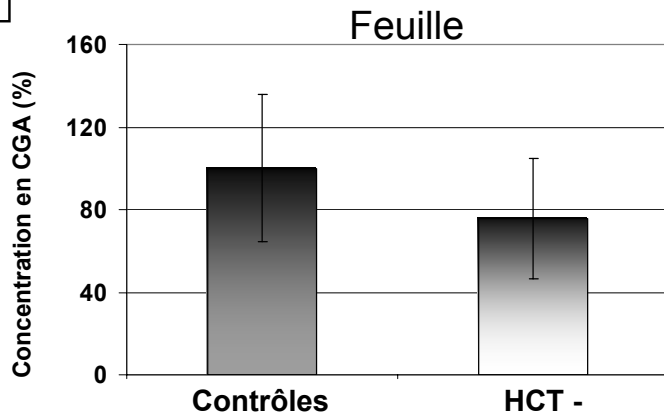
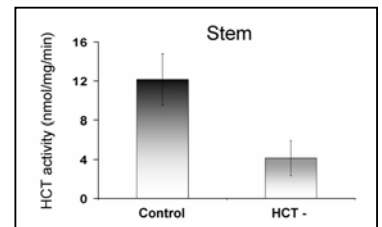
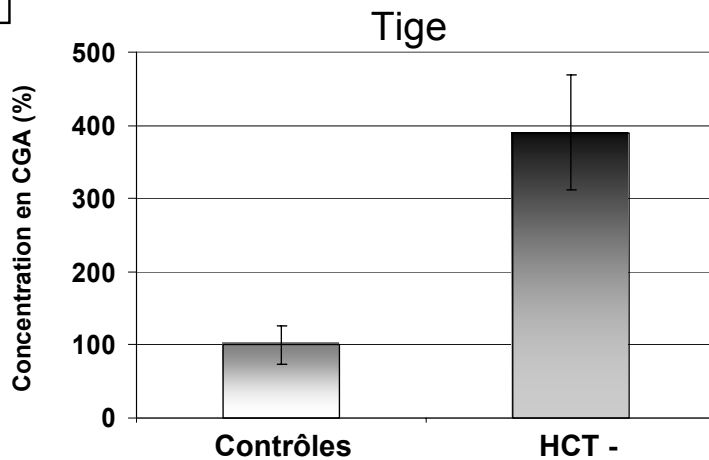
A**B**

Figure I 23. Concentration moyenne en acide chlorogénique (CGA) dans des plants de *N. benthamiana* témoins ou HCT - : exploitation des données présentées Fig I 22.

A : histogrammes présentant, dans les feuilles, la concentration moyenne d'acide chlorogénique exprimée en %, pour les plantes témoin et HCT- présentés Fig. I 22A.

B : histogramme présentant, dans la tige, la concentration moyenne d'acide chlorogénique exprimée en %, pour les plantes témoin et HCT- présentés Fig. I 22B.

Les encarts positionnés sur la droite représentent l'activité enzymatique HCT mesurée sur les mêmes échantillons (figure 7, article 2).

forme d'histogramme et exprimées en nmol/mg de poids frais (**Fig. I 22**). Ces concentrations tiennent compte des isomères 5 et 3.

Les variations observées entre les feuilles témoin et HCT- ne semblent pas significatives, la concentration en CGA présentant des fluctuations importantes. Par contre, les résultats obtenus pour les tiges sont beaucoup plus nets avec une augmentation de la concentration en CGA dans les tiges HCT-. Ces expériences confirment également que la concentration en CGA est nettement plus forte dans les feuilles que dans les tiges, d'un facteur 40 environ. La concentration moyenne de CGA a été calculée dans les feuilles et les tiges de plantes témoin et HCT-. Les calculs sont basés sur les valeurs présentées **Fig. I 22**. Les histogrammes de la **Fig. I 23** représentent la concentration moyenne en CGA exprimée en pourcentage, les valeurs moyennes de CGA obtenues pour les tissus de plantes témoin étant fixées arbitrairement à 100 %. Cette étude statistique confirme que les variations observées dans les feuilles témoin et HCT- ne sont pas ou peu significatives puisque les barres d'erreur sont chevauchantes. Une étude statistique sur un plus grand nombre d'échantillons devrait permettre d'être plus affirmatif. Par contre, dans les tiges, la répression du gène codant pour HCT conduit à une augmentation spectaculaire de 400% de la concentration en CGA. Pour expliquer cette différence entre les feuilles et les tiges, nous pouvons constater que la répression de l'activité HCT est également hétérogène entre ces deux tissus (figure 7, article 2). Les encarts de la **Fig. I 23** rappellent que l'activité HCT (mesurée sur les mêmes prélèvements) est nettement moins affectée dans les feuilles que dans les tiges, suggérant une corrélation directe entre le niveau de répression de l'activité et l'impact sur le métabolisme du CGA (avec des effets opposés). L'absence de diminution significative de la concentration du CGA dans les feuilles HCT- pourrait aussi s'expliquer par la présence du pool majoritaire de CGA avant la répression du gène *HCT*. L'accumulation de CGA dans les tiges HCT- pourrait constituer une explication à l'augmentation de l'intensité de la coloration au bleu de toluidine dans le cytoplasme des cellules parenchymateuses du xylème (**Fig. I 19F**).

Ces données démontrent que l'enzyme HCT, *in planta*, joue un rôle important dans le métabolisme du CGA, confirmant les activités enzymatiques mesurées avec la protéine HCT recombinante (article 1). En effet, *in vitro*, HCT est capable de conduire au CGA en présence d'acide quinique et de caféoyl-CoA, mais également au caféoyl-CoA en présence de CoASH et de CGA. L'augmentation de la concentration en CGA dans les tiges HCT- suggère que dans ces tissus HCT joue un rôle primordial dans le catabolisme du CGA pour conduire au caféoyl-CoA, la forme métaboliquement active conduisant aux monomères de la lignine. Cette observation implique notamment que le CGA serait fourni par d'autres tissus, les feuilles essentiellement, et que celui-ci, en l'absence de l'activité HCT, s'accumulerait. L'ensemble de ces résultats constitue un point de départ intéressant pour essayer de mieux comprendre le rôle du CGA dans le métabolisme de la plante et la fonction d'HCT dans la gestion du pool de CGA.

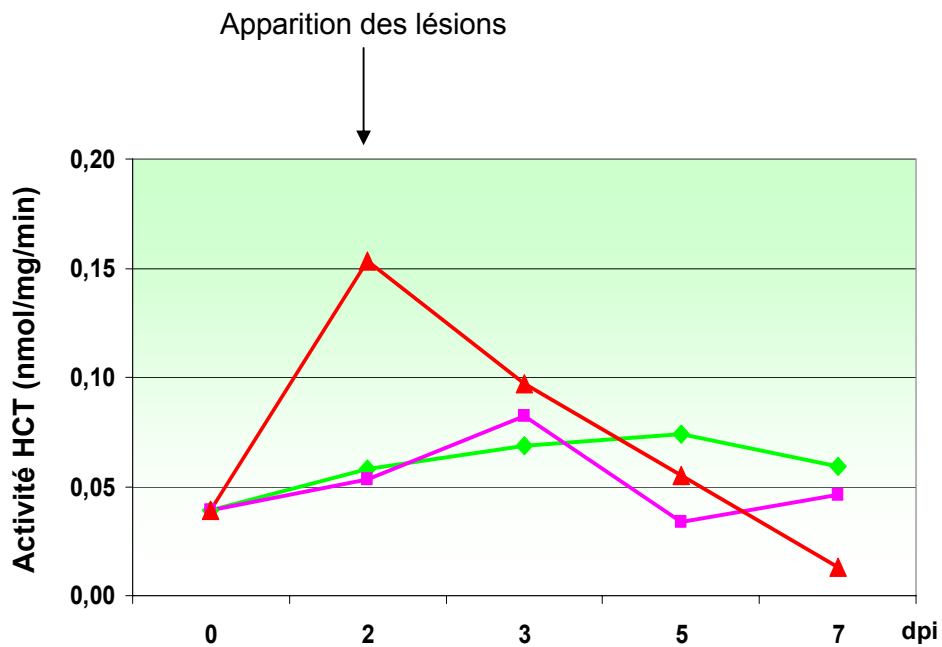


Figure I 24. Mesure de l'activité HCT au cours de la réaction d'hypersensibilité de *N. tabacum* au VMT.

- ▲ : feuilles infectées (prélèvements des lésions nécrotiques).
- : feuilles blessées à partir d'une solution d'eau et de célite.
- ◆ : feuilles non traitées.

dpi : jours après inoculation du virus.

La composition des phénols estérifiés aux parois a également fait l'objet d'analyses par CLHP. En effet, les esters de CoA dont la synthèse est sous le contrôle directe d'HCT, pourraient être les précurseurs des formes phénoliques liées aux parois. Les phénols pariétaux, de tige et de feuilles, ont été extraits à partir des mêmes échantillons témoin et HCT- utilisés pour l'analyse des phénols solubles. Cependant, aucune modification significative de la teneur ou de la nature de ces phénols n'a été décelée. Des analyses plus approfondies seront nécessaires avant de pouvoir tirer des conclusions.

3.4 L'enzyme HCT peut-elle jouer un rôle dans les mécanismes de résistance des plantes aux agents pathogènes? Mesure de l'activité HCT lors de la réaction d'hypersensibilité (RH) du tabac vis-à-vis du VMT.

L'expression de nombreux gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes est induite en réponse à l'agression par des agents pathogènes (Dixon et Paiva, 1995). L'implication d'HCT au sein du métabolisme des phénylpropanoïdes, ainsi que la capacité de cette enzyme à métaboliser le composé phénolique soluble le plus abondant chez le tabac, l'acide chlorogénique, nous a conduit à étudier l'expression de la protéine dans des feuilles de *N. tabacum* Samsun NN infectées par le VMT (voir Matériel et Méthodes). L'interaction entre le VMT et ce cultivar de tabac conduit à l'un des mécanismes de résistance les plus efficaces chez les plantes, la réaction d'hypersensibilité (RH). Cette réponse de défense se caractérise par une nécrose des cellules végétales entourant le site de pénétration du virus et, autour de la nécrose, par le renforcement des barrières mécaniques de la cellule, la synthèse de protéines anti-microbiennes (Pathogenesis-Related) et l'induction de métabolismes secondaires (voir paragraphe 1.5.2.).

Les premières expériences visant à suivre l'expression de la protéine HCT au cours de la virose ont été menées par immunodétection. Les résultats obtenus n'ont pas été concluants, la technique utilisée n'étant pas assez sensible pour mettre en évidence l'expression de la protéine HCT (résultats non montrés).

Nous avons alors mesuré l'activité HCT au cours de la virose. Pour mettre en évidence une induction de l'activité HCT lors de la RH, des lésions nécrotiques ont été prélevées 2, 4, 5 et 7 jours après inoculation (**Fig I 24**). Il a été nécessaire de procéder à une série de prélèvements témoin. Le limbe de plantes non traitées a été prélevé au cours de la croissance de la plante afin de tenir compte des variations liées au développement. Parallèlement, des plantes ont été soumises uniquement à traitement dit de « blessure »; les feuilles ont été frottées à l'eau mais en présence de la célite afin de vérifier si l'activité HCT pouvait être induite par la blessure. Les activités HCT présentées **Fig I 24** sont exprimées en nmol de produit formé / mg de protéine / min et ces valeurs constituent une moyenne sur deux expériences indépendantes. Dans les feuilles témoin, l'activité HCT présente un niveau basal

très faible comparable à celui mesuré dans les expériences présentées Figure 3C, article 2. Lors de l'infection on peut observer une stimulation : l'activité augmente au moment de l'apparition des lésions nécrotiques; puis l'activité diminue progressivement jusqu'au septième jour après l'infection. Ce profil de stimulation de l'activité HCT est comparable à celui observé pour d'autres enzymes de la voie des phénylpropanoïdes lors de la RH de feuilles de tabac vis-à-vis du VMT (Legrand *et al.*, 1976a; Maury *et al.*, 1999). Ceci suggère une régulation coordonnée des enzymes de ce métabolisme qui conduit à la synthèse de composés aux propriétés antimicrobiennes tels que les coumarines ou encore au renforcement pariétal grâce à l'incorporation de composés phénoliques. Une faible induction de l'activité HCT est également observée 3 jours après la blessure, mais elle n'est pas significative. Il s'agit de résultats préliminaires qui restent à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons et en se focalisant sur des temps plus précoces après infection.

Parallèlement à la stimulation de l'activité HCT, nous avons observé une augmentation de la concentration en CGA à proximité des lésions nécrotiques à partir du troisième jour après infection (résultats non montrés) suggérant une corrélation entre l'induction de l'activité HCT et l'accumulation du CGA. Ces résultats laissent également supposer un rôle de cette enzyme dans la régulation du pool de CGA au niveau des feuilles. Ces données vont dans le sens des résultats obtenus à partir des plantes de *N. benthamiana* réprimées pour le gène *HCT*. Même si l'inhibition de l'activité HCT au niveau des feuilles semble conduire à une diminution faible de la concentration en CGA (**Fig. I 23A**), les quantités de CGA étant importantes et variables (**Fig. I 22A**), il est possible que les fluctuations de la biosynthèse ne se répercutent que lentement et soient difficiles à mettre en évidence. L'utilisation de précurseurs marqués pourrait s'avérer utile et beaucoup plus sensible. De telles études de radiomarquage ont déjà été réalisées sur *N. tabacum*, variété Samsun NN en marquant des feuilles saines ou infectées par le VMT par absorption pétiolaire de L-phénylalanine-¹⁴C (Legrand *et al.*, 1971; Fritig *et al.*, 1972). Ces expériences ont permis de montrer une induction de la synthèse *de novo* du CGA à proximité des lésions nécrotiques, atteignant un maximum deux jours après l'infection. La comparaison des radioactivités spécifiques des isomères 3, 4 et 5 du caféoylquinique a démontré que l'isomère 5 était le précurseur métabolique des deux autres (Legrand *et al.*, 1971). Ceci a été corroboré par les résultats de Stockig et Zenk (1974) qui ont montré qu'une acyltransférase partiellement purifiée à partir de suspensions cellulaires de *N. alata* synthétisait l'isomère 5 du caféoylquinique.

La stimulation de l'activité HCT, lors de la RH, indique une fonction de cette enzyme dans les mécanismes de résistance des plantes aux agents pathogènes. Son implication dans les processus de lignification au cours du développement normal de la plante (article 2) permet de postuler pour un rôle dans le renforcement des barrières mécaniques au site d'infection grâce au dépôt de composés de type « lignin like ».

Conclusions

Au début de l'étude de la voie de biosynthèse de la lignine, l'ensemble des réactions chimiques étaient considérées comme intervenant au niveau des acides hydroxycinnamiques (HCAs). Puis, la purification des enzymes de la voie chez différentes espèces végétales, le clonage des gènes correspondants, les études biochimiques sur les protéines recombinantes, le génie génétique et la génomique ont permis d'avoir une vision plus juste mais également considérablement plus complexe de cette voie.

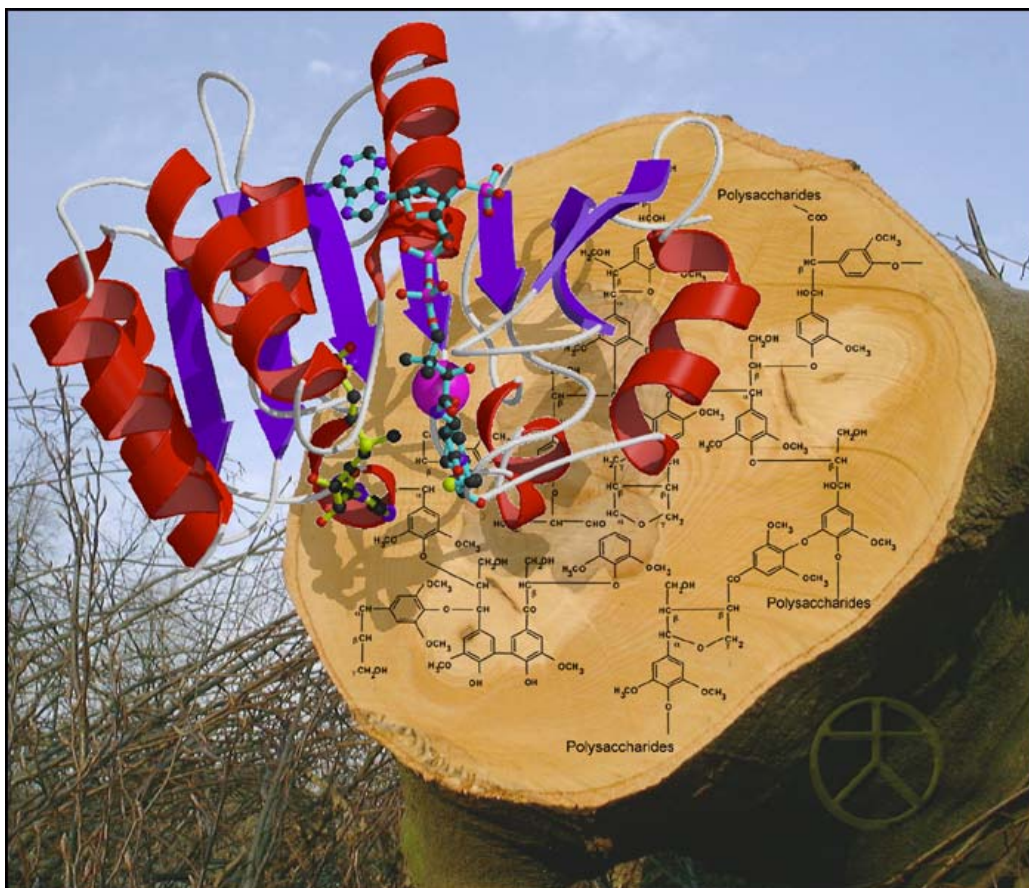
Dernièrement, la caractérisation d'une enzyme longtemps restée inconnue, a mis en lumière l'intervention de nouveaux intermédiaires métaboliques, en plus des esters de CoA, des aldéhydes et des alcools. En effet, la réaction d'hydroxylation en position 3 du noyau aromatique est catalysée par la C3H, un cytochrome P450, ayant pour substrat les esters shikimique et quinique d'acide *p*-coumarique (Schoch *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2002 a, b). Cette découverte implique l'existence d'une autre enzyme de type acyltransférase, capable de synthétiser ces composés.

Les travaux que je viens de présenter dans ce premier chapitre ont permis de caractériser cette enzyme à activité Hydroxy Cinnamoyl Transférase (HCT). HCT est une enzyme monomérique d'environ 50kDa capable de synthétiser *in vitro* les substrats de la C3H grâce à une réaction de trans-estérification. Ses meilleurs substrats sont le *p*-coumaroyl-CoA et le caféoyl-CoA pour les donneurs d'acyles, et les acides shikimique et quinique pour les accepteurs. La démonstration de l'implication du produit du gène *HCT* dans le métabolisme des phénylpropanoïdes, et plus précisément dans la lignification des tissus conducteurs, a été réalisée *in planta*, par une approche de « Virus Induced Gene Silencing ». Les plantes réprimées pour le gène *HCT* présentent un ralentissement de leur croissance, une modification de la morphologie des feuilles et une altération dans le développement des tiges et des racines. L'analyse de la lignine de ces plantes a permis de montrer une diminution d'environ 15% de la teneur en lignine, ainsi qu'une réduction de l'incorporation des unités diméthoxylées (S) au profit des unités non méthoxylées (H). Des analyses complémentaires ont révélé un impact de la répression du gène *HCT* sur la composition des phénols solubles (acide chlorogénique) et sur l'organisation des tissus conducteurs. L'induction de l'activité HCT lors de la réaction d'hypersensibilité (RH) du tabac par le VMT indique également un rôle de cette enzyme, comme beaucoup d'autres intervenant dans le métabolisme des phénylpropanoïdes (Dixon et Paiva, 1995), dans les mécanismes de défense des plantes aux agents pathogènes.

En conclusion, ce travail a permis de caractériser une nouvelle enzyme du métabolisme des phénylpropanoïdes à activité acyltransférase (HCT) et de démontrer l'importance de cette enzyme dans la biosynthèse de la lignine.

Chapitre II.

Détermination du site actif de la caféoyl-coenzyme A 3-*O*-méthyltransférase (CCoAOMT) de tabac impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes; modélisation tridimensionnelle et mutagenèse dirigée.



Chapitre II.

Détermination du site actif de la caféoyl-coenzyme A 3-*O*-méthyltransférase (CCoAOMT) de tabac impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes; modélisation tridimensionnelle et mutagenèse dirigée.

1. Introduction	109
1.1 Les <i>O</i> -méthyltransférases impliquées dans la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes	110
1.2 Diversité et signatures des méthyltransférases S-adénosyl-L-méthionine-dépendantes de plantes	111
1.3 Comparaison des CCoAOMTs de plantes avec les catéchol OMTs animales et modèle tridimensionnel de la CCoAOMT de tabac	112
1.4 Analyses biochimiques et identification du site actif de la CCoAOMT de tabac	113
2. Article 3	115

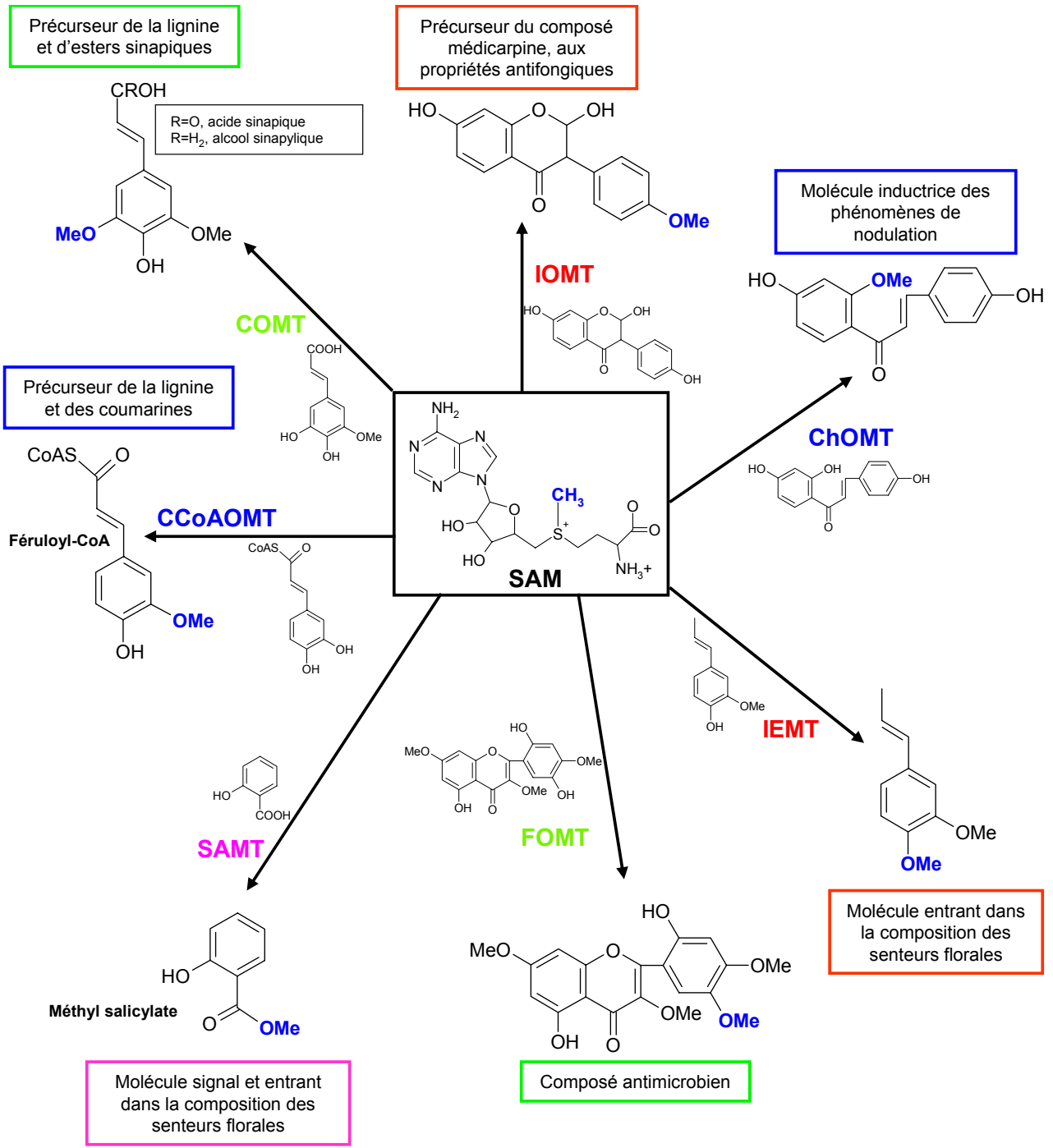


Figure II 1. Les O-méthyltransférases de plantes dépendantes de la SAM. Exemples d'O-méthyltransférases impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes.

IOMT : isoflavone OMT; COMT : acide caféique OMT; CCoAOMT : caféoyl-CoA OMT; SAMT : acide salicylique OMT; FOMT : flavonol OMT; IEMT : (iso)eugénol OMT; ChOMT : chalcone OMT; SAM : S-Adénosyl-L-méthionine.

Chapitre II : Détermination du site actif de la caféoyl-coenzyme A 3-O méthyltransférase (CCoAOMT) de tabac impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes; modélisation tridimensionnelle et mutagenèse dirigée.

1. Introduction

Les réactions de méthylation, présentes aussi bien chez les bactéries et les champignons que chez les plantes et les animaux sont catalysées par des méthyltransférases qui constituent une classe d'enzymes particulières (n° 2.1.1., selon la nomenclature officielle internationale). Elles assurent la synthèse d'un grand nombre de molécules aux fonctions très variées. Il existe plusieurs types de méthyltransférases suivant qu'elles transfèrent le groupement méthyle sur un atome de carbone (les C-méthyltransférases, impliquées dans la biosynthèse des stérols par exemple), un atome d'azote (les N-méthyltransférases, impliquées dans la maturation post-traductionnelle de certaines protéines ou la biosynthèse des alcaloïdes) ou sur un atome d'oxygène (les O-méthyltransférases impliquées par exemple dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes).

Les plantes produisent plus de 100.000 composés dérivant principalement des voies biosynthétiques des phénylpropanoïdes, des isoprénoïdes et des alcaloïdes. Dans cette diversité des métabolites secondaires, les méthyltransférases jouent un rôle important. Plus particulièrement, de nombreuses O-méthyltransférases impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes ont été caractérisées (**Fig. II 1**). La variété des molécules méthoxylées dérivant de ce métabolisme nécessite un nombre important d'O-méthyltransférases capables non seulement de reconnaître un squelette carboné donné mais également de méthyler une fonction unique sur des composés aux substitutions hydroxyle et carboxyle nombreuses (**Fig. II 1**). Ces composés phénoliques interviennent dans des processus aussi variés que la synthèse du support mécanique de la plante (lignine), la défense contre les agents pathogènes (coumarines) ou la pigmentation des fleurs (anthocyanes) (Douglas, 1996). Notre étude va se focaliser sur l'une des deux O-méthyltransférases (OMT) de plantes impliquées dans la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes, la CCoAOMT. La CCoAOMT et la COMT, la deuxième OMT de la voie générale, ont fait l'objet de nombreuses études chez *N. tabacum*. Elles diffèrent par leur spécificité de substrat, leur structure et leur origine phylogénétique.

1.1 Les *O*-méthyltransférases impliquées dans la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes

1.1.1 Les COMTs

Trois isoformes de tabac (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) ont été purifiées au laboratoire (Legrand *et al.*, 1976b; Collendaveloo *et al.*, 1981). Leur purification à homogénéité a montré que ces enzymes possèdent une masse moléculaire apparente de 39 kDa (COMT I), et 41-42 kDa (COMT II et III). Les trois isoformes transfèrent le groupement méthyle de la SAM sur le groupement hydroxyle en *méta* des acides caféique et 5-OH férulique et leurs esters de CoA avec une grande spécificité de position, mais elles sont capables de méthyler en *para* certains substrats (Legrand *et al.*, 1978; Collendaveloo *et al.*, 1981; Maury *et al.*, 1999). Ces trois isoformes sont induites dans l'anneau de cellules entourant les lésions nécrotiques après infection par le VMT, la stimulation des isoformes II et III étant 2 à 5 fois plus importante que celle de l'isoforme I (Legrand *et al.*, 1978). Cette stimulation a pour origine la synthèse *de novo* des trois isoformes (Dumas *et al.*, 1988; Jaeck *et al.*, 1992). Ces données biochimiques ont permis de classer les COMTs en deux classes : la classe I s'exprime dans les tissus sains et la classe II, comprenant les isoformes II et III, est plus spécifiquement impliquée dans les réactions de défense. Les gènes de COMT I s'expriment surtout dans les tissus vasculaires, notamment le xylème en cours de lignification (Jaeck *et al.*, 1996). Ils sont également induits dans les feuilles après infection par le VMT (Jaeck *et al.*, 1996; Martz *et al.*, 1998).

1.1.2 Les CCoAOMTs

L'étude de la CCoAOMT de tabac a été initiée à la suite des résultats obtenus avec les tabacs transgéniques inhibés pour la COMT I (Atanassova *et al.*, 1995). En effet, la lignine de ces plantes se caractérise par une diminution des unités S, alors que la teneur en unités G n'est pas diminuée. Ces résultats indiquaient qu'une autre enzyme, non affectée par la transformation, catalysait la première étape de méthylation menant à l'acide férulique et à l'unité G de la lignine. La CCoAOMT ayant déjà été décrite dans d'autres espèces végétales comme pouvant intervenir dans la lignification, sa participation dans la première étape de méthylation semblait fort probable. L'analyse par Southern-blot montre que la CCoAOMT est codée par une famille multigénique (Martz *et al.*, 1998). A partir d'une sonde hétérologue d'ADNc de persil, une banque d'ADNc de feuilles de tabac infectées par le VMT a été criblée et ce criblage a permis d'isoler quatre clones (Martz *et al.*, 1998). Ces 4 clones (CCoAOMT-1 à 4), d'une taille de 890 pb à 1014 pb, possèdent une forte identité de séquence nucléotidique (entre 84 et 93%) ainsi qu'un pourcentage d'identité de 97% au niveau de la séquence protéique. Ces 4 clones ne partagent que 77 à 80% d'identité avec deux autres clones (CCoAOMT-5 et 6) isolés par RT-PCR à partir de séquences disponibles dans les bases de



Figure II 2. Classification des différents ADNc de CCoAOMT de tabac (Maury *et al.*, 1999).

La famille 1 comprend 4 ADNc présentant environ 90% d'identité au niveau de la séquence nucléotidique. Les familles 2 et 3 ne comportent qu'un seul ADNc. Les familles sont identiques entre elles à environ 78%.

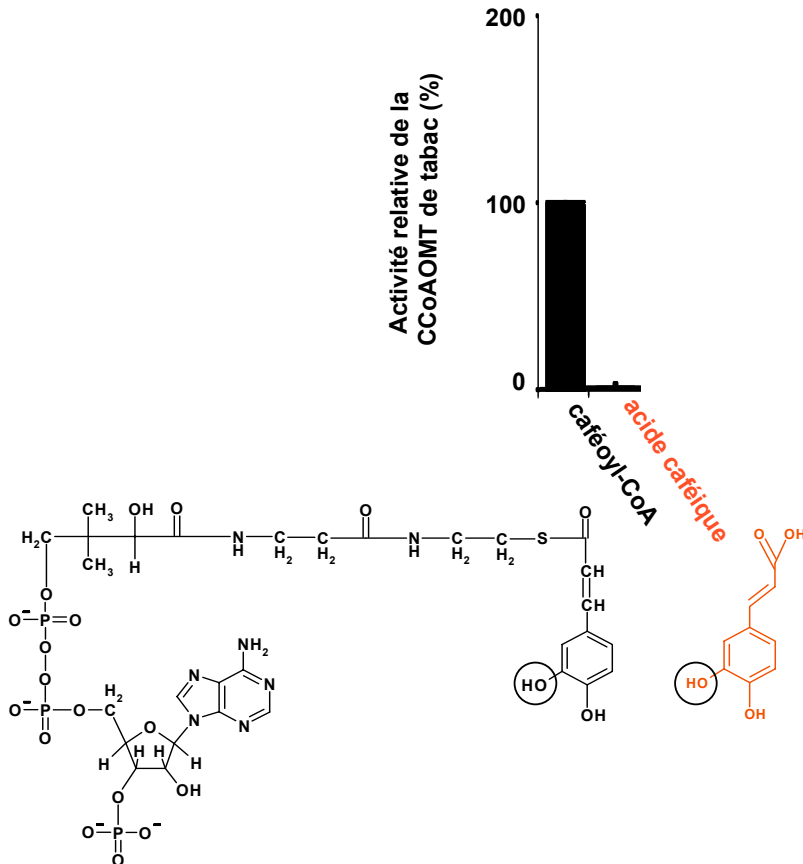


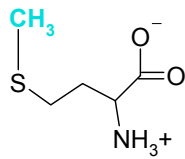
Figure II 3. Spécificité de substrat de la CCoAOMT de tabac vis-à-vis du caféoyl-CoA et de l'acide caféique : ces données biochimiques mettent en évidence l'importance de la chaîne latérale de CoA dans la capacité de l'enzyme à méthyler la fonction hydroxyle en position *meta* (cercle) du noyau aromatique. L'activité enzymatique est mesurée en déterminant le pourcentage de conversion du groupement caféoyl en féruloyl grâce à l'utilisation de SAM tritiée (Maury *et al.*, 1999; article 3).

données (Busam *et al.*, 1997b). Les comparaisons de séquence permettent de classer ces clones en trois familles : la classe 1 qui comprend les CCoAOMT-1 à 4 et les classes 2 et 3 correspondant aux CCoAOMT-5 et 6 respectivement (**Fig. II 2**). Les différents clones ont été exprimés dans *E. coli* (Maury *et al.*, 1999). Les protéines recombinantes des classes 1 et 2 ont une masse moléculaire apparente de 27 kDa tandis que l'enzyme de classe 3 a une masse d'environ 32 kDa. Les 6 isoformes de CCoAOMTs présentent une spécificité de substrat stricte vis-à-vis des esters de CoA et plus particulièrement vis-à-vis du caféoyl-CoA (Maury *et al.*, 1999) (**Fig. II 3**). Les profils d'expression des trois classes de CCoAOMTs diffèrent au cours de l'infection par le VMT et du développement de la tige. L'activité CCoAOMT est induite après infection par le VMT et les protéines des trois classes s'accumulent (Maury *et al.*, 1999). Au cours du développement, les gènes des trois classes s'expriment tout le long de la tige excepté aux extrémités. Ces profils d'expression de la CCoAOMT sont en accord avec l'implication de cette enzyme dans la lignification (Maury *et al.*, 1999).

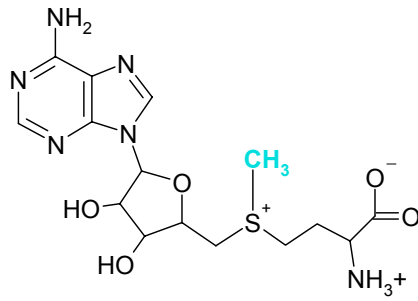
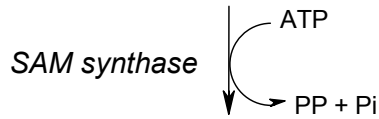
1.2 Diversité et signatures des méthyltransférases S-adénosyl-L-méthionine-dépendantes de plantes

Les deux classes d'*O*-méthyltransférases de la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes diffèrent tout d'abord par leur séquence primaire. L'étude de la relation de l'ensemble des séquences d'*O*-méthyltransférases caractérisées chez les plantes à l'aide d'un arbre phylogénétique (Joshi et Chiang, 1998) montre que ces enzymes présentent des homologies. Les auteurs ont défini deux groupes d'enzymes : le premier, constitué de protéines d'une longueur de 344 à 383 résidus, contient entre autres les acides caféique *O*-méthyltransférases (COMT) ou encore la chalcone et l'isoflavone *O*-méthyltransférase (**Fig. II 1**). Le deuxième groupe est uniquement constitué des caféoyl-CoA *O*-méthyltransférases (CCoAOMT) possédant environ 231 à 248 résidus (**Fig. II 1**). Les membres de ces deux familles d'*O*-méthyltransférases méthylent les fonctions hydroxyles de composés phénylpropanes. Une troisième famille peut être proposée incluant des enzymes de type carboxyle *O*-méthyltransférases telles que l'acide salicylique et l'acide benzoïque *O*-méthyltransférases, respectivement SAMT (**Fig. II 1**) et BAMT. Ces OMTs convertissent les acides carboxyliques en esters méthyliques.

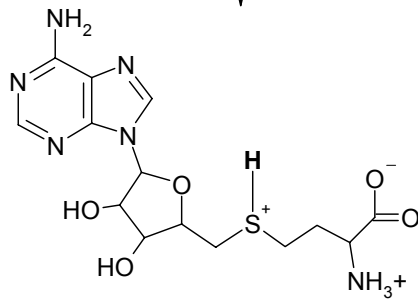
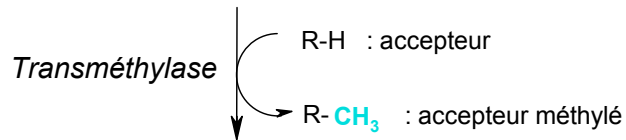
Malgré la diversité des substrats méthylés, toutes les OMTs possèdent des caractéristiques communes. D'une manière générale, il existe deux principaux cofacteurs, donneurs de groupement méthyle : la S-adénosyl-L-méthionine (ou SAM) et l'acide tétrahydrofolique (ou FH₄). Ce dernier intervient dans la biosynthèse des ribonucléotides puriques, la formation des désoxyribonucléotides thymidiques, les interconversions glycine-sérine et la synthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine. Mais, comme pour la majorité des méthyltransférases, les *O*-méthyltransférases utilisent la SAM comme donneur



Méthionine



S-adénosyl-L-méthionine (SAM)



S-adénosyl-L-homocystéine (SAH)

Figure II 4. Utilisation de la SAM, par les méthyltransférases, comme donneur de groupement méthyle. Synthèse de la SAM et réaction de transméthylation.

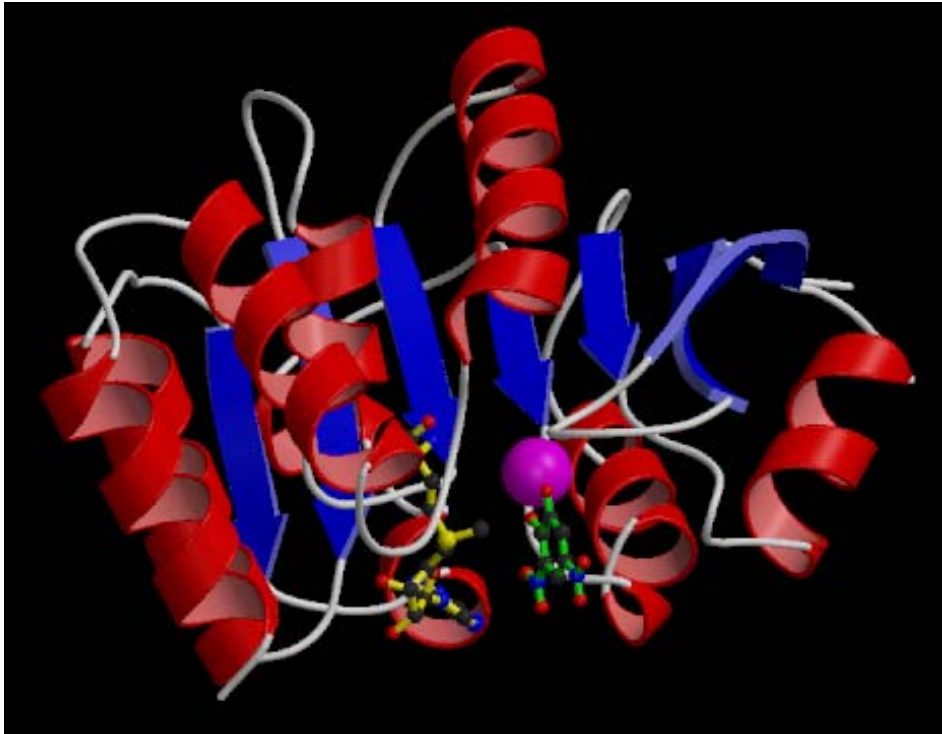
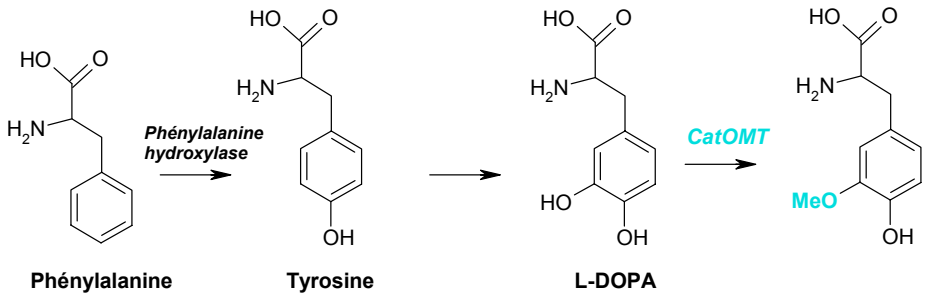


Figure II 5. Structure tridimensionnelle de la Catéchol OMT de rat (1VID) (Vidgren *et al.*, 1994).

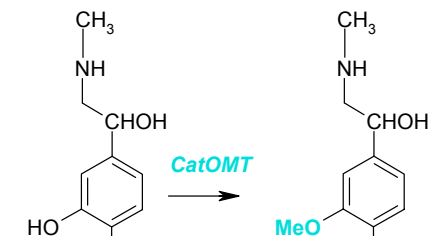
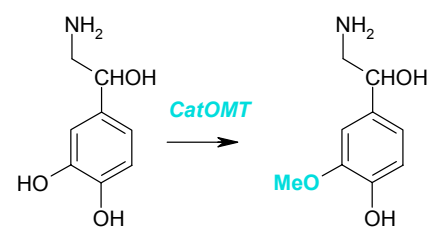
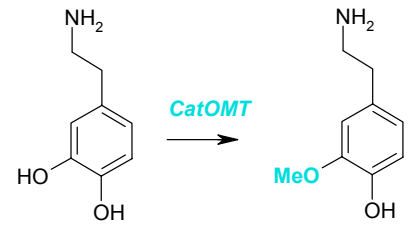
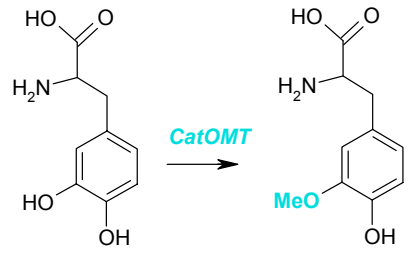
Les hélices- α , les feuillets- β et les boucles sont respectivement représentés par des hélices rouges, des flèches bleues et des filaments gris. Le Mg^{2+} est représenté par la sphère violette. La SAM est constituée du squelette carboné jaune, alors que celui du 3,5-dinitrocatéchol, un inhibiteur de la CatOMT, est en vert. Les atomes de carbone sont en noir, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu et l'atome de soufre de la SAM en jaune. *Représentation réalisée par Marc Bergdoll.*

A
L
I
M
E
N
T
A
T
I
O
N



Hormones
thyroïdiennes

Acides acétoacétique
et fumarique
(cycle de Krebs)



\longleftrightarrow \longleftrightarrow

Neurotransmetteurs actifs **Neurotransmetteurs inactifs**

Figure II 6. Métabolisme simplifié de la phénylalanine chez les animaux et rôle de la catéchol OMT (CatOMT) dans la voie des neurotransmetteurs.

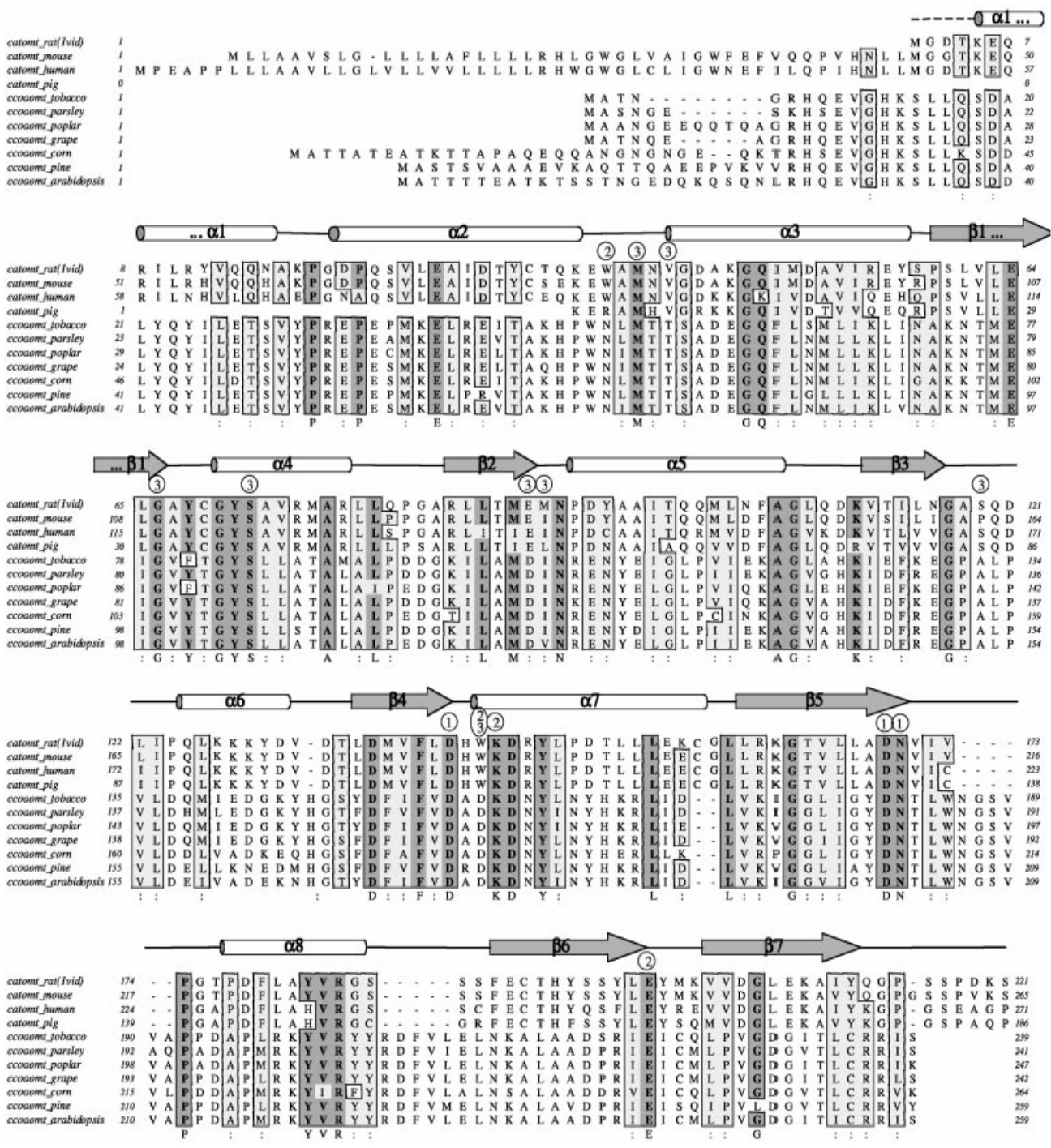


Figure II 7. Alignement des séquences protéiques et conservation des structures secondaires entre les CatOMTs animales et les CCoAOMTs de plantes. Comparaison de 4 séquences de CatOMTs animales (rat, souris, homme et cochon) avec 7 séquences de CCoAOMTs végétales (tabac, persil, peuplier, vigne, maïs, pin et *Arabidopsis*). Les résidus conservés dans au moins 8 protéines sur 11 sont encadrés en gris foncé et indiqués sur la ligne du bas. Les résidus similaires sont encadrés en gris clair et représentés par les symboles « : » .Les résidus identifiés dans la structure tridimensionnelle de rat (1VID) comme interagissant avec le Mg^{2+} (1), le substrat phénolique (2) et la SAM (3) sont indiqués au-dessus de la séquence 1VID. Les structures secondaires conservées sont présentées sous forme de cylindre pour les hélices- α et sous forme de flèche pour les feuillets- β .

du groupement méthyle. La SAM intervient dans la synthèse de très nombreuses molécules du métabolisme des phénylpropanoïdes, mais aussi dans la méthylation des ARN-t et chez les animaux dans la synthèse de neurotransmetteurs comme l'adrénaline (voir plus loin). La structure de la SAM, qui dérive de la méthionine, et le mécanisme général de transméthylation faisant intervenir la SAM comme substrat sont présentés **Fig. II 4**.

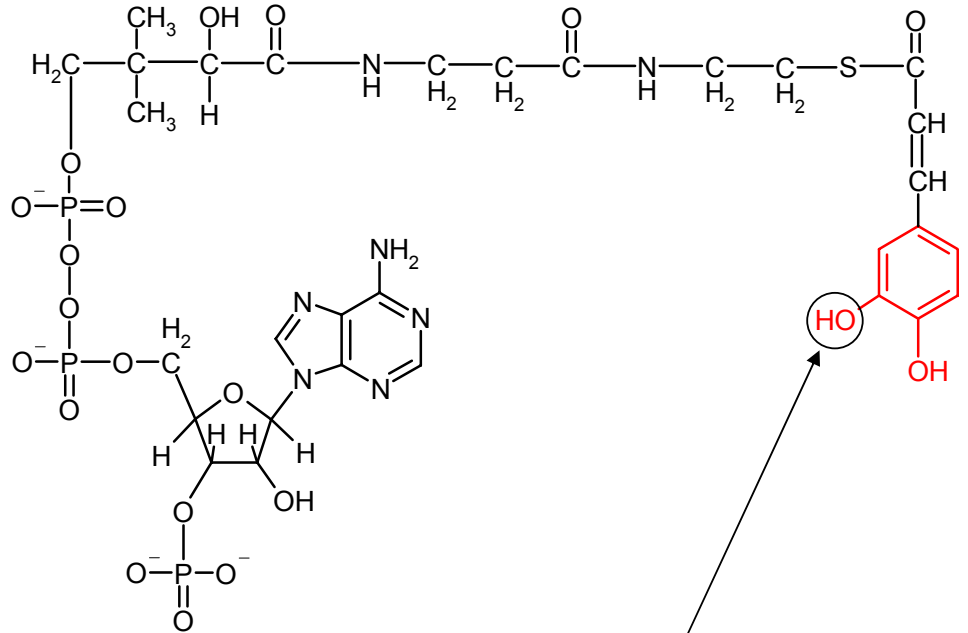
L'existence de cette caractéristique commune (SAM, donneur de méthyle) se répercute sur la structure des OMTs. De nombreux travaux ont cherché à identifier des motifs structuraux conservés ou « signatures » chez les OMTs de plantes (Bugos *et al.*, 1991; Gowri *et al.*, 1991; Collazo *et al.*, 1992; Kagan et Clarke, 1994; Ibrahim, 1997; Ibrahim *et al.*, 1998; Joshi et Chiang, 1998; Zubieta *et al.*, 2001, 2002). C'est en 1991, suite aux premiers clonages des COMTs que les premières recherches de motifs conservés sont publiées (Bugos *et al.*, 1991; Gowri *et al.*, 1991). Cinq motifs sont alors définis dont trois seraient spécifiquement impliqués dans la fixation de la SAM. Ces 5 motifs ont été retrouvés chez les COMTs de classe I (Jaeck *et al.*, 1996) et de classe II (Pellegrini *et al.*, 1993) de tabac. Une étude récente (Joshi et Chiang, 1998), s'appuyant sur un plus grand nombre de séquences incluant celles des CCoAOMTs, a permis de préciser ces motifs consensus.

Notre objectif étant d'identifier des résidus à la fois importants pour l'activité et surtout responsables de la spécificité de substrat de la CCoAOMT, nous avons entrepris de modéliser la structure de la CCoAOMT en utilisant la structure 3D de la catéchol OMT (CatOMT) de rat qui était déjà connue.

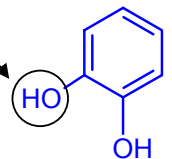
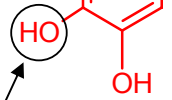
1.3 Comparaison des CCoAOMTs de plantes avec les catéchol OMTs animales et modèle tridimensionnel de la CCoAOMT de tabac

Plusieurs études de la structure primaire de la CCoAOMT (Ye *et al.*, 1994; Martz *et al.*, 1998; Joshi et Chiang, 1998) ont utilisé la comparaison de séquence avec la catéchol OMT (CatOMT) de rat (Salminen *et al.*, 1990), car il s'agissait de la seule structure d'OMT cristallisée (**Fig. II 5**) (Vidgren *et al.*, 1994). Cette enzyme isolée chez d'autres mammifères comme le porc (Lundström *et al.*, 1991) et l'homme (Bertocci *et al.*, 1991) est connue depuis plusieurs années pour intervenir dans la biosynthèse d'une hormone, la mélatonine (Axelrod et Weissbach, 1960), et dans le métabolisme des neurotransmetteurs à catécholamine du système nerveux central (Axelrod et Tomchick, 1958; Assicot et Bohuon, 1970; Flohe et Schwabe, 1970; White et Wu, 1975) tels que l'adrénaline, la nor-adrénaline, la L-DOPA et la dopamine (**Fig. II 6**). La méthylation de ces neurotransmetteurs conduit à leur inactivation, et un dérèglement de l'activité enzymatique CatOMT est à l'origine, chez l'homme, de divers désordres psychiatriques et de maladies neurologiques (Guldborg et Marsden, 1975) telles que la maladie de Parkinson (Nutt, 1998). La **Fig. II 7** constitue un agrandissement de la figure 2A de l'article 3 qui va suivre et représente l'alignement des séquences protéiques entre

Caféoyl-CoA, substrat de l'enzyme végétale (CCoAOMT)



Groupements hydroxyles des substrats diphenoliques méthylys par la CCoAOMT et la CatOMT.



Catéchol, substrat de l'enzyme animale (CatOMT)

Figure II 8. Substrats de la CCoAOMT végétale et de la CatOMT animale. Ces deux enzymes sont des orthodiphenol O-méthyltransférases car elles méthylient sur le cycle aromatique un groupement hydroxyle (en position *meta* dans le cas de la CCoAOMT).

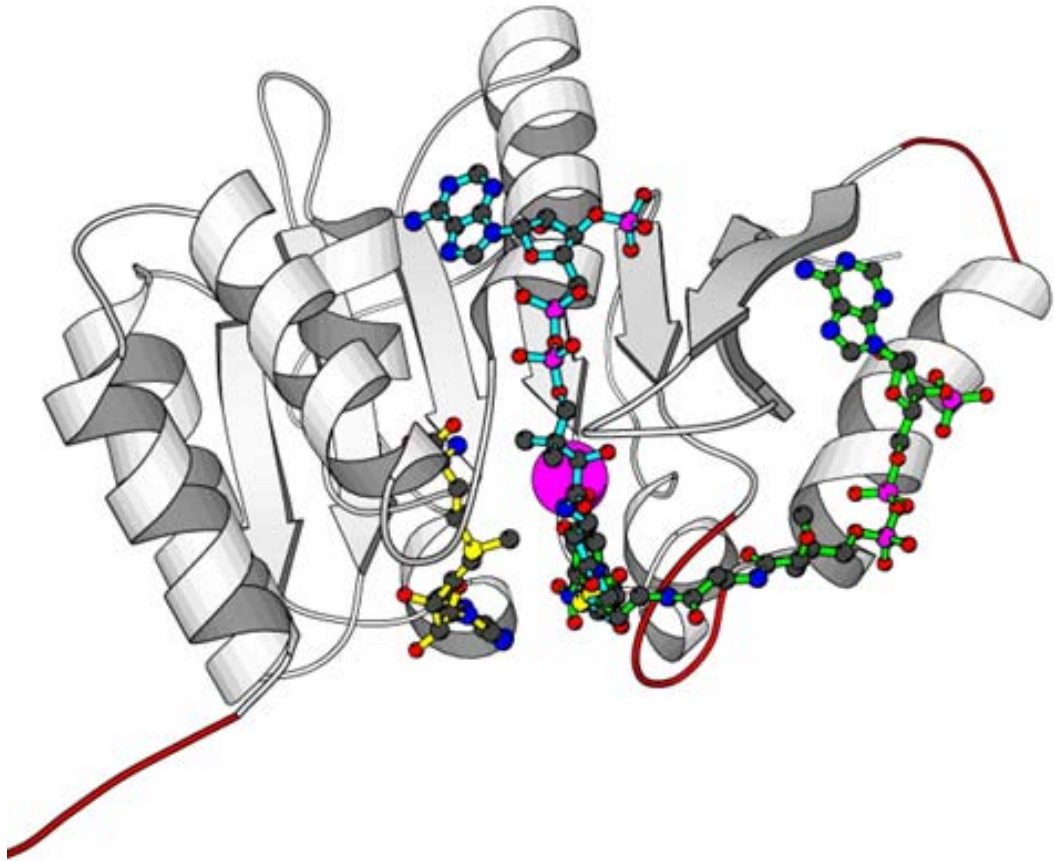


Figure II 9. Modèle tridimensionnel de la CCoAOMT de tabac; l'enzyme possède à sa surface deux poches susceptibles d'accueillir la chaîne latérale de CoA du caféoyl-CoA.

Les structures secondaires sont représentées en grisé; l'extension Nt et les deux boucles internes spécifiques à la CCoAOMT sont en rouge. Les hélices- α et les feuillets- β sont respectivement représentés par des hélices et des flèches. Le Mg^{2+} est représenté par la sphère violette. La SAM est constituée du squelette carboné jaune. Dans la première poche hypothétique de fixation, la chaîne carbonée du caféoyl-CoA est en vert alors que dans la deuxième poche elle est en bleu. Les atomes de carbone sont en noir, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu et les atomes de soufre de la SAM et de la liaison thiolester du caféoyl-CoA en jaune. *Représentation réalisée par Marc Bergdoll.*

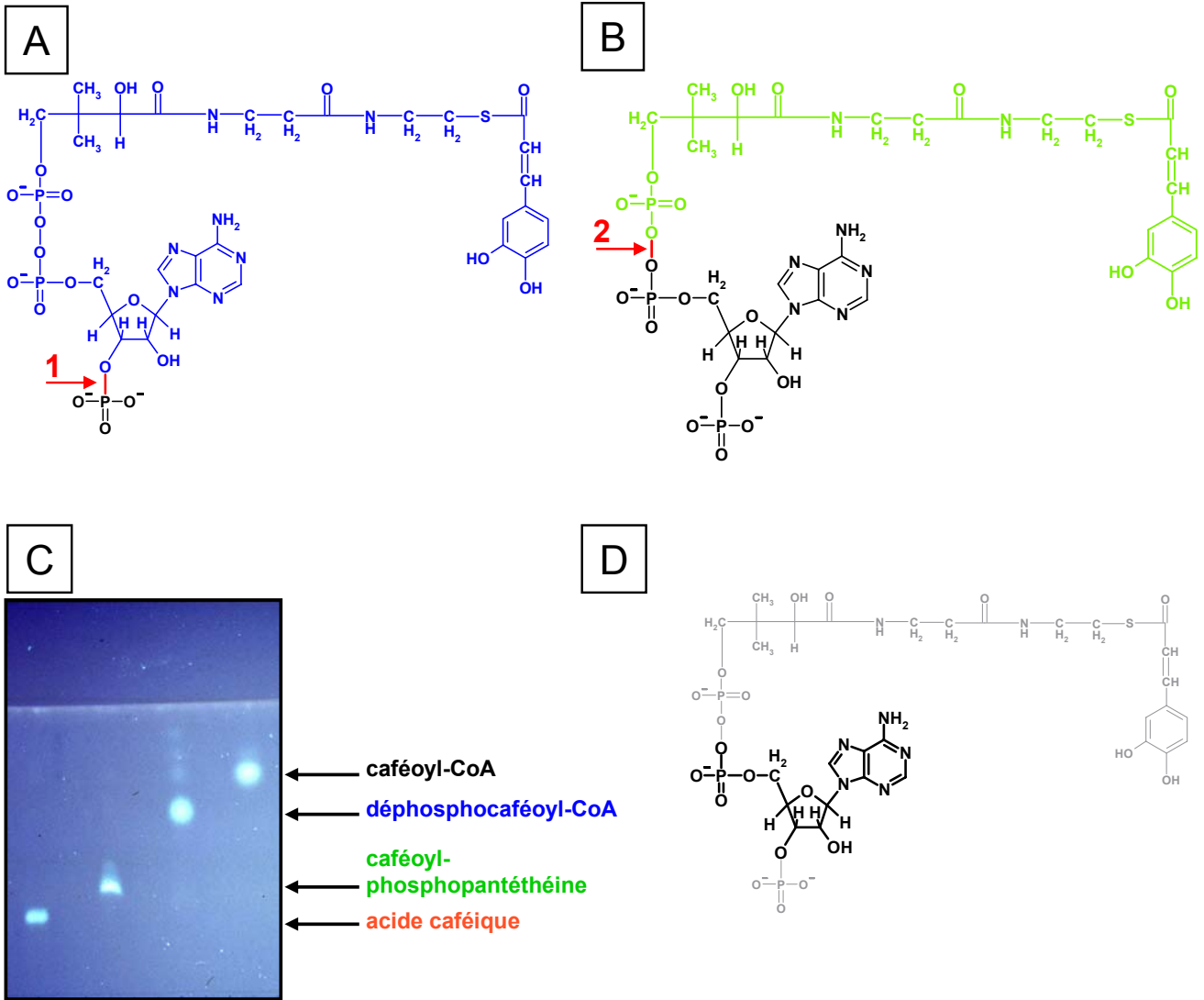


Figure II 10. Production par voie enzymatique, séparation puis purification des dérivés du caféoyl-CoA.

A : obtention du déphospho-caféoyl-CoA (bleu), par action d'une phosphatase (1).

B : obtention du caféoyl-phosphopantéthéine (vert), par action d'une pyrophosphatase (2).

C : séparation des dérivés du caféoyl-CoA par CCM de cellulose.

D : importance du groupement adénosine 5'-monophosphate (en noir) du caféoyl-CoA dans la reconnaissance du substrat par la CCoAOMT.

4 CatOMTs animales et 7 CCoAOMTs végétales. Cette comparaison entre la CatOMT et la CCoAOMT se justifie par plusieurs arguments :

- 1- La catéchol OMT de rat (221 résidus) a une taille semblable à celle de la CCoAOMT (240 résidus pour celle de tabac).
- 2- La CCoAOMT, tout comme la CatOMT, est une enzyme monomérique (Geoffroy et Maury, résultats non publiés).
- 3- Ces deux enzymes sont des orthodiphenol *O*-méthyltransférases car elles méthylent un des groupements hydroxyles de substrats ortho-diphénoliques (**Fig. II 8**).
- 4- Elles utilisent la SAM comme cofacteur.
- 5- Elles nécessitent également du magnésium (Mg^{2+}) comme cofacteur.
- 6- Elles interviennent dans le métabolisme de la phénylalanine (**Fig. 19 et Fig. II 6**).
- 7- Elles possèdent environ 50 % de similarité au niveau protéique, soit plus qu'entre la CCoAOMT et la COMT de tabac (46-48 %).
- 8- L'alignement de leurs séquences montre que les résidus importants pour la fixation de la SAM et du Mg^{2+} sont conservés (**Fig. II 7**) (Ye *et al.*, 1994; Maury *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces données a permis de modéliser la structure générale de la CCoAOMT de tabac grâce aux coordonnées cristallographiques de la CatOMT de rat (**Fig. II 9**) (Vidgren *et al.*, 1994). La **Fig. II 9** montre que la structure générale des deux enzymes est identique et que seule une extension Nt et deux boucles (en rouge) diffèrent entre les deux modèles. Ces boucles correspondent en fait à des séquences de CCoAOMT qui n'existent pas dans la structure de rat. Mais ce modèle, au sein duquel on peut positionner la SAM, le Mg^{2+} et le noyau aromatique de l'accepteur portant les deux hydroxyles, ne permet pas de comprendre avec précision comment la CCoAOMT reconnaît spécifiquement le caféoyl-CoA.

1.4 Analyses biochimiques et identification du site actif de la CCoAOMT de tabac

Afin de savoir comment le caféoyl-CoA se fixe sur la CCoAOMT, il nous fallait dans un premier temps déterminer quels atomes de la chaîne latérale du caféoyl-CoA (**Fig. II 8**) étaient importants dans la formation du complexe Enzyme/Substrat. Notre approche a consisté à synthétiser par voie enzymatique deux dérivés du caféoyl-CoA : le déphosphocaféoyl-CoA (**Fig. II 10A**), obtenu en faisant agir une phosphatase, et le caféoyl-phosphopanthétéine, par action d'une pyrophosphatase qui permet d'éliminer le groupement adénosine-diphosphate (**Fig. II 10B**). Les différents dérivés du caféoyl-CoA ont ensuite été séparés par CCM, puis purifiés pour être testés comme substrat vis-à-vis de la CCoAOMT (**Fig. II 10C**). De façon surprenante, l'activité vis-à-vis du déphosphocaféoyl-CoA est supérieure à celle mesurée avec le caféoyl-CoA lui-même. Il est donc possible que le substrat utilisé par la CCoAOMT soit en

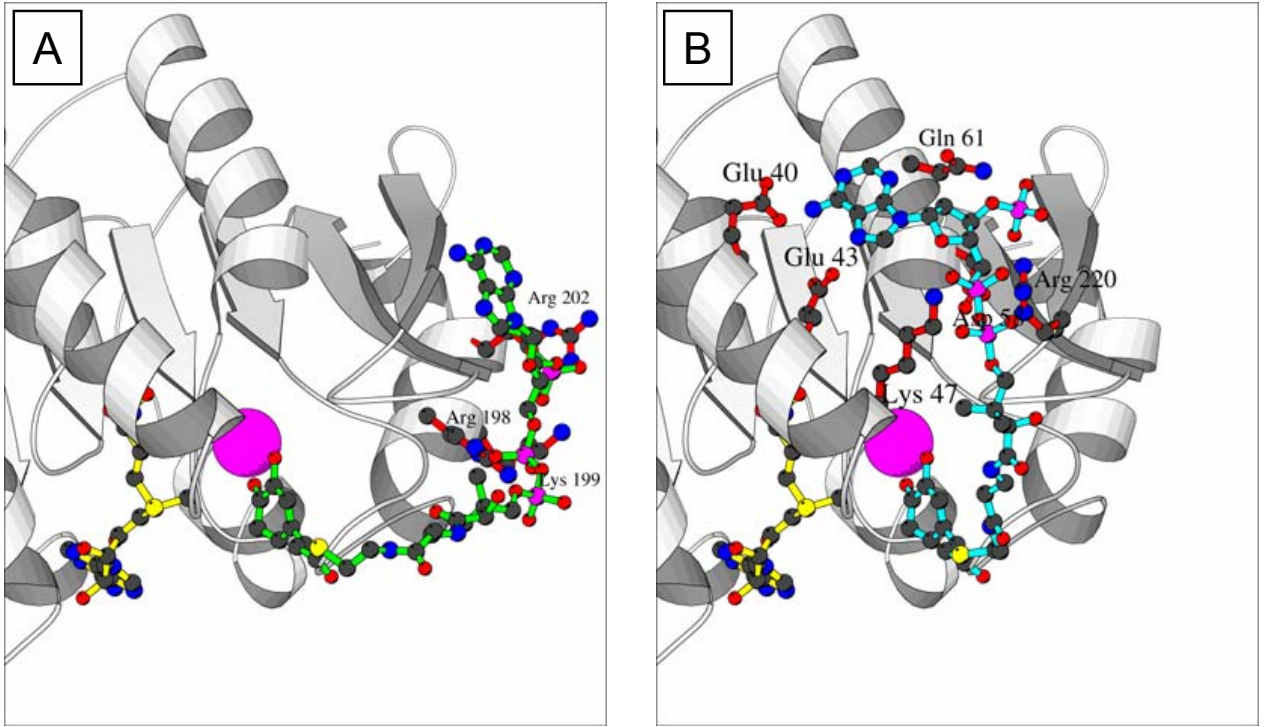


Figure II 11. Zoom sur les deux poches hypothétiques de fixation de la chaîne latérale de CoA du caféoyl-CoA au sein du modèle tridimensionnel de la CCoAOMT de tabac. Pour chaque poche les acides aminés susceptibles d'interagir avec la charge négative du phosphate sont indiqués, suivis de leur numéro de position dans la séquence protéique.

Les structures secondaires sont représentées en grisé; les hélices- α et les feuillets- β sont respectivement représentés par des hélices et des flèches. Le Mg^{2+} est représenté par la sphère violette. La SAM est constituée du squelette carboné jaune. Dans la première poche de fixation la chaîne carbonée du caféoyl-CoA est en vert (A) alors que dans la deuxième poche elle est en bleu (B). Les atomes de carbone sont en noir, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu et les atomes de soufre de la SAM et de la liaison thiolester du caféoyl-CoA en jaune. *Représentations réalisées par Marc Bergdoll.*

fait le déphosphocaféoyl-CoA, car on sait que les tissus de tabac possèdent une activité phosphatase élevée (Negrel et Smith, 1984). Par contre, l'absence du groupement adénosine 3-5, diphosphate fait chuter considérablement l'efficacité de la réaction (figure 3B, article 3). Ces données biochimiques mettaient en évidence l'importance du groupement adénosine 5'-monophosphate dans la reconnaissance et la formation du complexe Enzyme/Substrat (**Fig. II 10D**). A partir du modèle tridimensionnel de la CCoAOMT présenté **Fig. II 9.**, Marc Bergdoll a recherché à la surface de la protéine des acides aminés chargés positivement et susceptibles de réaliser des liaisons électrostatiques avec la charge négative du groupement phosphate en 5' de l'adénosine. Deux possibilités d'interaction de l'enzyme avec son substrat étaient envisageables et sont présentées **Fig. II 9 et II 11**.

Afin de savoir laquelle de ces deux possibilités était la bonne, nous avons utilisé la mutagenèse dirigée par PCR afin de substituer des acides aminés basiques, spécifiques à chaque poche, par des acides aminés neutres de même taille. Puis, nous avons comparé l'activité de ces protéines recombinantes mutées à celle de la protéine sauvage vis-à-vis du caféoyl-CoA. La substitution de certains de ces acides aminés et la délétion de régions spécifiques de la CCoAOMT a permis de réduire significativement voire d'abolir l'activité enzymatique de la protéine végétale

Ainsi, la combinaison des approches bioinformatiques, biochimiques et biophysiques nous a notamment permis d'identifier trois acides aminés clefs intervenant dans la reconnaissance spécifique de la chaîne latérale de CoA du caféoyl-CoA par la CCoAOMT de tabac. L'ensemble de ces travaux est présenté plus en détail dans l'article qui suit (article 3).

2. Article 3. Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis.

The Journal of Biological Chemistry
Vol. 276, No. 39, pp. 36831-36838, 2001

Identification of the Enzymatic Active Site of Tobacco Caffeoyl-coenzyme A *O*-Methyltransferase by Site-directed Mutagenesis*

Received for publication, May 31, 2001

Published, JBC Papers in Press, July 17, 2001, DOI 10.1074/jbc.M104977200

Laurent Hoffmann‡, Stéphane Maury‡§, Marc Bergdoll‡, Laurent Thion¶, Monique Erard¶, and Michel Legrand‡||

From the ‡Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Louis Pasteur, 12 rue du Général Zimmer, 67000 Strasbourg, France and the ¶Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale du CNRS, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex, France

Animal catechol *O*-methyltransferases and plant caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferases share about 20% sequence identity and display common structural features. The crystallographic structure of rat liver catechol *O*-methyltransferase was used as a template to construct a homology model for tobacco caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase. Integrating substrate specificity data, the three-dimensional model identified several amino acid residues putatively involved in substrate binding. These residues were mutated by a polymerase chain reaction method and wild-type and mutant enzymes were each expressed in *Escherichia coli* and purified. Substitution of Arg-220 with Thr resulted in the total loss of enzyme activity, thus indicating that Arg-220 is involved in the electrostatic interaction with the coenzyme A moiety of the substrate. Changes of Asp-58 to Ala and Gln-61 to Ser were shown to increase K_m values for caffeoyl coenzyme A and to decrease catalytic activity. Deletions of two amino acid sequences specific for plant enzymes abolished activity. The secondary structures of the mutants, as measured by circular dichroism, were essentially unperturbed as compared with the wild type. Similar changes in circular dichroism spectra were observed after addition of caffeoyl coenzyme A to the wild-type enzyme and the substitution mutants but not in the case of deletion mutants, thus revealing the importance of these sequences in substrate-enzyme interactions.

In plants, phenylpropanoid metabolism provides a large array of compounds involved in the development and interactions with the environment. Among these products are flower pigments, antibiotics termed phytoalexins that accumulate in diseased plants, signals implicated in the recognition of microbes, UV irradiation protectants, and building units of lignin (1, 2). Lignin is the second most abundant organic polymer on Earth after cellulose. It provides rigidity to the plant cell wall, mechanical strength to tree trunks, and impermeability to plant vascular tissues (3, 4). Phenylpropanoid compounds are also valuable compounds in the human diet. They have been reported to have antioxidant effects, vasodilatation capacity, and anti-inflammatory and -cancer chemopreventive activities (5–7).

Among the enzymes involved in phenylpropanoid biosynthesis in plants, two *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet)¹-dependent *O*-methyltransferases (OMTs) catalyze the introduction of two methyl groups at positions 3 and 5 on the aromatic ring of monolignols, the lignin building units. Comparison of plant OMT sequences showed that they belong to two different families (8–14) that display distinct expression patterns and substrate preferences (15–18). One OMT type is specific for esters of coenzyme A and is called caffeoyl-CoA OMT (CCoAOMT, Fig. 1) whereas the other type accepts as substrates the hydroxycinnamoyl-CoA esters, hydroxycinnamyl alcohol and aldehyde derivatives and free acid forms (such as caffeic acid). This second type has been dubbed caffeic acid OMT I (COMT I). Two plant OMTs belonging to this latter family, namely chalcone OMT and isoflavone OMT, have recently been structurally characterized (19). To understand the structural basis of the high degree of specificity of plant CCoAOMTs for hydroxycinnamoyl-CoA esters, we constructed a three-dimensional model taking advantage of the structural conservation between plant CCoAOMT enzymes and animal OMTs whose three-dimensional structure is known.

In animals, catechol OMTs (CatOMTs) are important in the central nervous system where they metabolize levodopa and catecholamine neurotransmitters such as dopamine and adrenaline into inactive compounds (20, 21). In the therapy of Parkinson's disease, a common neurodegenerative disorder, inhibitors of CatOMT are used in combination with levodopa to prolong the availability of levodopa to the brain of the patients (22–24). The crystallographic structure of rat liver CatOMT has been solved (25, 26) (1VID in the protein data bank) and was used in the present work as a template to construct a homology model for the tobacco CCoAOMT, which shares about 20% identity and 49% similarity with the animal enzyme.

AdoMet-dependent methyltransferases originating from different kingdoms and methylating a large variety of substrates have been shown to share common structural features (26–30). CatOMTs from animal sources appear to be the methyltransferases closest to plant CCoAOMTs. Not surprisingly, most of the residues shown to interact with *S*-adenosyl-L-methionine and Mg²⁺ cofactors in rat CatOMT crystals (26) are well conserved in plant CCoAOMTs that require the same cofactors. Concerning the phenolic acceptor substrates of animal and plant enzymes, catechol and caffeoyl-CoA have the same orthodihydroxy substitution on the aromatic ring although the CoA moiety is only present in the latter. Moreover, the CoA moiety has been shown to be essential to CCoAOMT activity since free

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Present address: Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, Faculté des Sciences, Université d'Orléans, BP 6759, 45067 Orléans cedex 2, France.

|| To whom correspondence should be addressed. Tel.: 333 88 41 72 80; Fax: 333 8861 44 42; E-mail: michel.legrand@ibmp-ulp.u-strasbg.fr.

¹ The abbreviations used are: AdoMet, *S*-adenosyl-L-methionine; OMT, *O*-methyltransferase; GST, glutathione *S*-transferase; CCoAOMT, caffeoyl-CoA OMT; CatOMTs, catechol OMTs; COMT I, caffeic acid OMT I.

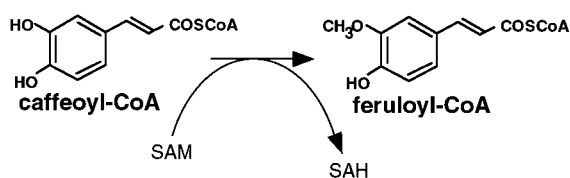


FIG. 1. **Enzymatic reaction catalyzed by CCoAOMT.** The methyl group of *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) is transferred by CCoAOMT to the meta hydroxyl group of caffeoyl-CoA, yielding feruloyl-CoA and *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH).

caffeic acid is not a substrate for the plant enzyme (18). To determine which part of the caffeoyl-CoA molecule is crucial for CCoAOMT activity, truncated derivatives of caffeoyl-CoA were prepared and tested as substrates of tobacco CCoAOMT. The data enabled us to model the interactions of the protein with the CoA moiety of the thioester molecule, revealing two possible substrate binding sites. Site-directed mutagenesis of residues predicted by the model to be in close contact with the substrate, coupled with enzyme activity assays of the purified recombinant proteins, identified amino acid residues involved in the active site of the enzyme. Several mutant proteins in which one selected amino acid residue was substituted, were affected in enzyme activity. Moreover, deletions of the N terminus and of an internal loop present in the plant enzyme but not in animal CatOMT, were shown to abolish catalytic activity. All substitution and deletion mutants displayed circular dichroism (CD) spectra similar to that of the wild-type protein. These data indicate that the mutations did not induce a gross perturbation of protein folding and the mutated residues play a major role in the binding of the substrate by the enzyme. Interestingly, all the enzymes but the N terminus deletion mutant displayed changes in their CD spectra in the presence of the caffeoyl-CoA substrate. These results indicate that a conformational change of the enzyme is induced by the *o*-diphenolic substrate and the protein N-terminal extension plays a critical role in this process.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Commonly used chemicals and reagents were of the highest purity readily available. Bradford protein dye reagent was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). Acid phosphatase (Type I: from wheat germ) and nucleotide pyrophosphatase (Type II: from *Crotalus*) were obtained from Sigma. Restriction enzymes and buffers were purchased from Biolabs (Beverly, MA) or Life Technologies, Inc. (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). T4 DNA ligase and T4 polynucleotide kinase rATP were purchased from Life Technologies, Inc. Tritiated AdoMet (10 Ci/mmol) was obtained from PerkinElmer Life Sciences. Glutathione-agarose, isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside and AdoMet were purchased from Sigma. Tryptone and yeast extracts were from Difco laboratories (Sparks, MD). The anti-CCoAOMT antibodies were produced as described by Maury *et al.* (18). Purified oligonucleotides used for mutagenesis and DNA sequencing were provided by Life Technologies, Inc. custom primers.

Bacterial Strains and Plasmids—Cloning in the pGEX-KG vector (Sigma) and polymerase chain reaction screening for positive clones were described by Martz *et al.* (17). Protein expression was performed using *E. coli* strain TG2, a tetracycline-resistant strain derived from strain TG1 (Stratagene).

DNA Sequencing—DNA sequencing was performed by the method of Sanger *et al.* (31) using the rhodamine dye terminator cycle ready kit with AmpliTaq DNA polymerase FS (PerkinElmer) and an Applied Biosystems DNA sequencer (model 373A).

Site-directed Mutagenesis—The mutations were carried out using the QuickChange™ site-directed mutagenesis kit of Stratagene. Unless otherwise indicated, standard molecular biology procedures were used. All mutations were introduced by PCR amplification of the entire expression plasmid using two mutated oligonucleotide primers. For substitution mutations, two complementary primers carrying the mutation were used. The sequences of the sense primers used for the substitution of the amino acid(s) indicated were the following, with the modified codons underlined and the nucleotide changes indicated in bold: W50L/N51W,

5'-GCAAAACACCCCT**TGTGG**CTCATGACCACC; R220T, 5'-GGCTGCT-GATTCAACAATCGAAATTTGCC; R198S/K199T/R202T, 5'-CCTGATG-CACCTCTTAGCACATACGTTACGTATTATAGAGATTTTC; E40Q, 5'-GC-CTGAGCCCATGAAACAGCTAAGAGAGATCACCGC; E43S, 5'-GCCCAT-GAAAGAGCTAAGATCGATCACCGCAAACACCC; K47A, 5'-GCTAA-GAGAGATCACCGCAGCACACCCCTGGAACCTC; D58A, 5'-CCTCAT-GACCACCTCTGCC**GCT**GAAGGGCAATTCTTGAGC; Q61S, 5'-CCTCT-GCCGATGAAGGG**TCAT**TCTTGAGCATGCTTATC. For deletion mutations, sense and antisense primers were devised so as to hybridize to opposite strands of the expression plasmid outside the region targeted for deletion. The sequences of primers used for deleting the internal loop (Asn-186 to Ala-191) were: sense primer, 5'-CCACCTGATGCACCTCTTAGGAAAT-ACGTTAGGTATTATAGAG; antisense primer, 5'-CCATAGGGTGTAT-CATACCCAATTAGTCCACCAATTTTGACC. For the N-terminal deletion (Met-1 to Leu-16) the primers used were the following: sense primer, 5'-AGTGTATGCCCTTTATCAGTACATTCTTGAAACAGCGTGTACCC; antisense primer: 5'-GTCTAGAATTCCACCACCACCACCGGAAATTC-CGGGATCCACCGG.

Plasmid and polymerase chain reaction products were extracted and purified from agarose gels using kits purchased from Qiagen (Hilden, Germany). All mutations were confirmed by DNA sequencing of polymerase chain reaction products.

Expression and Purification of CCoAOMT Proteins—The pGEX-KG plasmids containing the wild-type or mutated CCoAOMT coding region were electroporated into TG2 *E. coli* strain. A 10-ml preculture was grown overnight at 37 °C in 2× yeast extract tryptone/glucose medium containing 2% glucose and 50 mg/l tetracycline and 100 mg/l ampicillin. This culture was used to inoculate 100 ml of fresh medium to which 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside was added to induce protein expression. Cells were grown for 1 h at 42 °C and then transferred at 25 °C for 6 h. After centrifugation for 10 min at 4000 rpm the bacteria were resuspended in 5 ml of phosphate-buffered saline solution containing 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1% β -mercaptoethanol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 5 mM benzamide. Cells were lysed by two passages through a French Press (Aminco, Maryland). The bacterial lysate was centrifuged at 11,000 rpm for 30 min, the pellet discarded, and beads of glutathione-agarose (Sigma) were added to the supernatant containing soluble proteins. The fixation of proteins was carried out for 2 h at room temperature. Then, the beads were washed three times with cold phosphate-buffered saline, and the fusion protein was directly cleaved by incubation of beads with thrombin for 1 h at room temperature. The supernatant containing the recombinant CCoAOMT protein was concentrated on Centricon 10 concentrators (Amicon, Ranvers, MA). The different steps of purification were assessed by electrophoresis on a 12% SDS-polyacrylamide gel. Electrophoresis and immunoblotting were performed as described by Geoffroy *et al.* (32). The amount of recombinant CCoAOMT protein in each sample was quantified by densitometry of bands on SDS-polyacrylamide gels stained with Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka, Switzerland).

Enzyme Activity Measurements—CCoAOMT activity was determined as described by Ye *et al.* (14). Pig CatOMT (Sigma) and tobacco recombinant CCoAOMT were incubated with 40 μ M AdoMet, 200 μ M MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, and 40 μ M of the *o*-diphenolic substrate in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. For K_m determination, caffeoyl-CoA concentration varied between 30 and 300 μ M. The K_m and V_{max} values were calculated from the Lineweaver-Burk plots. The meta/para methylation ratio was determined after saponification of reaction products and separation of labeled ferulic and isoferulic acids by TLC on silica gel (Merck, Darmstadt, Germany) in a benzene/acetic acid/water (6:7:3, v/v/v) system (organic phase).

Chemical Synthesis and Purification of Substrates—Caffeoyl-CoA was prepared according to the method of Stöckigt and Zenk (33) with some modifications (34) and identified and quantified spectrophotometrically as described by Lüderitz *et al.* (35). Dephosphocaffeoyl-CoA and caffeoyl-phosphopantetheine were prepared using phosphatase or pyrophosphatase (Sigma), respectively, according to the instructions of the manufacturer. The incubation products were then separated by TLC on cellulose (Merck) using *n*-butanol/glacial acetic acid/water (5:2:3, v/v/v) solvent, visualized under UV light, and eluted in water before spectrophotometric analysis.

Circular Dichroism of Wild-type and Mutant Enzymes—Circular dichroic spectra were recorded at 4 °C with a Jobin-Yvon VI dichrograph. A cell of 1-mm optical path length was used to record spectra in the ultraviolet region (260–190 nm) of purified recombinant enzyme preparations at a peptide concentration of 0.4 mg/ml in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The results are presented as normalized molar ellipticity values $[\theta]$ on the basis of the mean amino acid residue mass of 110 Da.

Taking into account the sensitivity of the apparatus ($\Delta(\Delta A) = 10^{-6}$), the polypeptide concentration and the optical path length of the cell, the precision of the measurements is $\Delta(\theta) = \pm 10 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$.

Sequence Alignment—Sequence alignment and analysis was performed with GCG software (Wisconsin Package version 10.0, Genetic Computer Group, Madison, Wisconsin). In a first step, an alignment was produced automatically with the program Pileup using the default parameter values. This alignment was then modified by hand, using the program SeqLab, to improve the score in the C-terminal end where it was obviously inappropriate for three crucial residues (Asp-169, Asn-170, and Glu-199 in 1VID) that are known from the crystallographic structure to be involved in AdoMet binding. To improve the alignment, two gaps were introduced by hand in all the CatOMTs.

Three-dimensional Model Building—Modeling of CCoAOMT protein was carried out with the program Modeler (36) using sequence alignment data and 1VID coordinates. Residues from Asn-186 to Ala-191 and from Arg-205 to Leu-209 correspond to two insertions in the C-terminal part of CCoAOMT compared with the CatOMT protein (Fig. 2A). These segments, absent in 1VID, were built by imposing special restraints on the Modeler program as detailed in the Results section. The AdoMet molecule, Mg^{2+} ion, and the substrate aromatic ring bearing the two hydroxyls in the ortho position were kept in the same positions and conformations as seen in 1VID.

Modeling of Caffeoyl-CoA—Modeling of the CCoAOMT substrate into the homology model was done manually using program O (37). We made the assumption that the aromatic ring of the caffeoyl moiety occupies exactly the same position as the 3,5-dinitrocatechol ring in the structure 1VID. From this starting point, keeping the aromatic ring in a fixed position and using only rotations along the pantetheine chain of coenzyme A (see Fig. 3C), we docked the rest of the substrate molecule onto the surface of the protein.

RESULTS

Sequence Alignment—AdoMet-dependent methyltransferases of prokaryotic and eukaryotic origins share common sequence and structure motifs (26–30). In particular, animal CatOMTs and plant CCoAOMTs have similar molecular weight values, require Mg^{2+} ions for activity, and methylate ortho-diphenolic substrates. Fig. 2 shows sequence alignment and secondary structure elements of four animal CatOMTs with seven CCoAOMTs representative of more than twenty sequences that have been cloned in various plant species. Amino acid residues that have been demonstrated to interact with AdoMet or Mg^{2+} in CatOMT (26) appear well conserved in the plant enzymes. Together with the eight α -helices, the seven β -strands, and the typical α/β Rossmann fold found in both types of proteins (shown below the sequences in Fig. 2A), functionally important residues are conserved and provide anchoring points for the alignment process. Along the OMT sequences, several conserved amino acid stretches have been previously detected and proposed as characteristic OMT signatures (8, 9, 11, 38). Finally, it is worth noting that two internal regions and the N-terminal extension of CCoAOMTs are absent in rat CatOMT (Fig. 2A).

Model Building—From the sequence alignment of Fig. 2A, we constructed a three-dimensional model for the tobacco CCoAOMT using the crystal structure of the rat CatOMT (26) as template.

In AdoMet-dependent methyltransferases of animal or plant origin, the helices $\alpha 4$ – $\alpha 8$ and the parallel β -strands $\beta 1$ – $\beta 5$ are similar to the Rossmann fold found in alcohol dehydrogenase and implicated in NAD^+ binding. The last residue of $\beta 1$ of animal CatOMTs is Gly-66 and is conserved in all plant CCoAOMTs. In rat CatOMT the last residue in the $\beta 2$ -strand is Glu-90, which binds to the ribose hydroxyls of AdoMet (26). In dehydrogenases this residue corresponds to an Asp residue as is also the case in all the CCoAOMT sequences (Fig. 2A). In all methyltransferases of known structure, the first five strands are parallel while the C-terminal part of the sheet contains two antiparallel β -strands (29). The last parallel strand, β -5, connects to helix α -8, which connects to the outside strand, β -6.

This overall structure has been demonstrated in the rat CatOMT and is also found in the tobacco CCoAOMT model (Fig. 2B). The crystallographic study of rat CatOMT has shown that Met-40 orients the sulfur atom of AdoMet, with the electron-deficient methyl group pointing toward the nucleophilic hydroxyl of catechol (26). The amino group of the methionine moiety of AdoMet has hydrogen bonds to Asp-141, to the main chain oxygen of Gly-66 and to the side chain oxygen of Ser-72. All these residues, which interact with the methyl group donor in the rat enzyme active site correspond to conserved amino acid residues in CCoAOMTs.

The Mg^{2+} ion plays a major role in CatOMT catalytic activity. Inside the active site, Mg^{2+} is coordinated to the side-chain oxygens of Asp-141, Asp-169, and Asn-170 and to both catechol hydroxyls. The sixth position of the magnesium coordination has been suggested to be occupied by a water molecule (26). As for the residues involved in AdoMet binding, those interacting with Mg^{2+} ion are conserved in the CCoAOMT sequences (Fig. 2A).

For CatOMT catalytic activity, the exact positioning of the ortho-diphenolic substrate to the methyl group of AdoMet is possible because of the binding of the two hydroxyl groups to the Mg^{2+} ion. One substrate hydroxyl has an important hydrogen bond to the carboxyl oxygen of Glu-199 whereas the other is surrounded by three positively charged moieties, namely the Mg^{2+} ion, the methyl group of AdoMet and Lys-144. Similarly to the residues implicated in the binding of AdoMet and Mg^{2+} cofactors, Glu-199 and Lys-144 are conserved in all the plant CCoAOMTs (Fig. 2A).

In sum, the sequence conservation between CatOMTs and CCoAOMTs has allowed us to construct the homology model presented in Fig. 2C. Modeling of the CCoAOMT protein was carried out with the program Modeler (36) using the sequence alignment and the 1VID coordinates. No attempt was made to include residues from Met-1 to Leu-16 because of the lack of restraints; some residues (Leu-1 to Lys-13) do not have any counterpart in the rat sequence (Fig. 2A), while others (Ser-14 to Leu-16) correspond to CatOMT residues that are not ordered and invisible in the crystal and hence have no coordinates in 1VID. Residues from Asn-186 to Ala-191 and from Arg-205 to Leu-209 correspond to two insertions in the C-terminal part of CCoAOMT protein. The first segment which is inserted between strand $\beta 5$ and helix $\alpha 8$, was built in the conformation of a long loop. The second segment from Arg-205 to Leu-209 is located just after helix $\alpha 8$, and we imposed special restraints into the Modeler program to build Arg-205–Val-208 into an helical conformation, thus extending $\alpha 8$ by one supplementary turn. AdoMet and Mg^{2+} moieties were positioned as in 1VID and are presented in Fig. 2C together with the substrate aromatic ring bearing the two hydroxyl groups. At this stage, the lateral chain of caffeoyl-CoA molecule could not be modeled due to the lack of information about the role of CoA moiety in substrate-enzyme interactions. Important clues concerning this point were obtained, however, from the comparison of substrate specificities of the CatOMT and CCoAOMT enzymes.

Substrate Specificities of CatOMT and CCoAOMT—Commercially available pig CatOMT and recombinant tobacco CCoAOMT purified from *E. coli* cells, were incubated in the presence of various putative substrates (Fig. 3). Substrate specificities of the two enzymes were strikingly different. CatOMT efficiently methylated catechol and caffeic acid (Fig. 3A) while CCoAOMT did not (Fig. 3B). Concerning CCoAOMT, previous studies have shown that the tobacco enzyme is specific for hydroxycinnamoyl-CoA esters and does not accept free acid forms as substrates (18). To investigate which part of the CoA moiety is required for CCoAOMT activity, caffeoyl-CoA was hy-

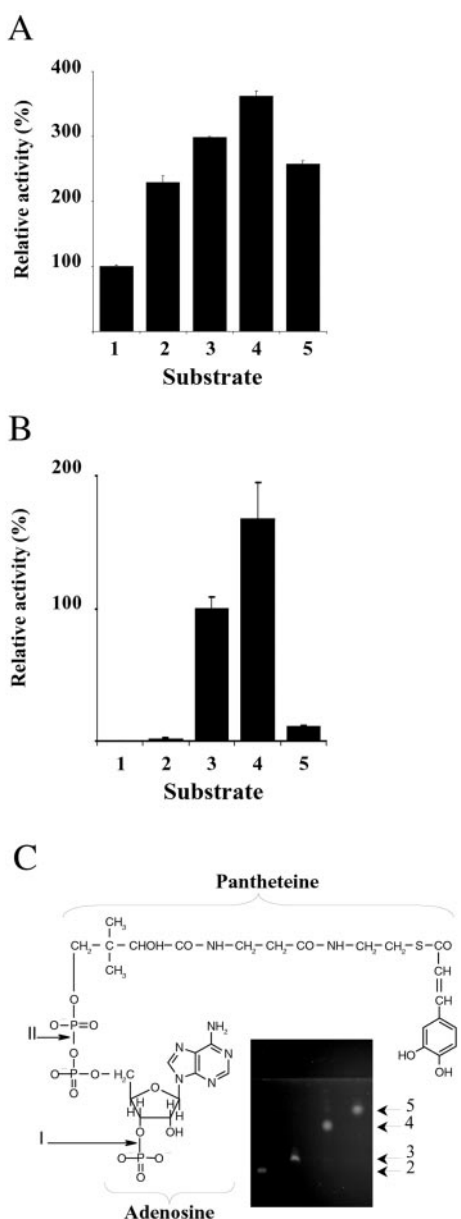


FIG. 3. Comparison of substrate specificities of animal and plant enzymes. Fig CatOMT (A) and tobacco CCoAOMT (B) were tested with catechol (lane 1), caffeic acid (lane 2), caffeoyl-CoA (lane 3), dephosphocaffeoyl-CoA (lane 4), or caffeoyl-phosphopantetheine (lane 5) as diphenolic substrates. C, dephosphocaffeoyl-CoA and caffeoyl-phosphopantetheine were obtained by the action of phosphatase (which hydrolyzed bond I) and pyrophosphatase (which hydrolyzed bond II) of the caffeoyl-CoA molecule. Caffeoyl-CoA hydrolysis products were separated by TLC as shown in the inset. Products 2, 3, 4, and 5 are as in A and B.

contrast, caffeoyl-phosphopantetheine was not a substrate at all (Fig. 3B). These data indicate that the adenosine 5'-monophosphate moiety of CoA ester is necessary for enzyme activity, probably because it binds to the CCoAOMT protein. On the other hand, it is noteworthy that caffeoyl-CoA and its truncated forms as well as free caffeic acid, compounds that are all typical products of plants, are substrates for CatOMT, an animal enzyme (Fig. 3A).

Putative Binding Sites for the CoA Moiety in CCoAOMT—We used the positions of the two hydroxyls of caffeoyl-CoA near the Mg^{2+} , Glu-199, and Lys-144 residues as an anchoring points to search for residues that might interact with the adenosine 5'-phosphate moiety of the substrate molecule. From this starting point, we performed rotations along the pantetheine chain

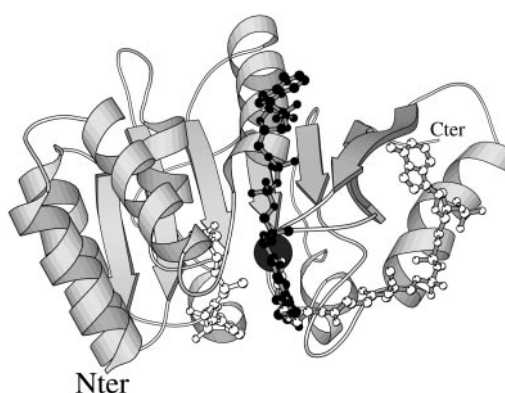


FIG. 4. Homology model showing the two putative caffeoyl-CoA binding sites of tobacco CCoAOMT. Basically the model is as in Fig. 2C with α -helices drawn as ribbons and β -strands as arrows, Mg^{2+} ion (shown as the gray sphere) and ortho-diphenolic ring being in the same position in the active site. Two possibilities of interaction of the rest of the caffeoyl-CoA molecule with the enzyme are presented in one case (white atoms and gray bonds) the molecule binds the pocket that includes Arg-198, Lys-199, and Arg-202; in the other possible position, (black atoms and gray bonds) the CoA ester molecule is docked to the Arg-220 pocket.

of coenzyme A (see Fig. 3C) to dock the rest of the substrate molecule onto the surface of the protein. Two clefts on the surface of the CCoAOMT model represent two potential mutually exclusive sites for adenosine 5'-phosphate recognition and binding. In particular, the position of positively charged residues that may bind to the negatively charged oxygen atom of the phosphodiester bond have been examined. We hypothesized that the additional loop (Asn-186–Ala-191), which is conserved in all CCoAOMTs and absent in CatOMTs (Fig. 2) has a crucial role in CCoAOMT-substrate interactions. Therefore we closely examined the two possibilities shown in Fig. 4 where the CoA moiety is in close contact with Arg-220 in one case (Fig. 4, CoA atoms in black and bonds in gray) or with Arg-202, Lys-199, and Arg-198 in the other (Fig. 4, CoA atoms in white and bonds in gray).

Site-directed Mutagenesis—Residues predicted from the model to interact with the substrate molecule were selected and substituted by site-directed mutagenesis. Deletion of the N-terminal extension and the Asn-186–Ala-191 insertion, which is close to the active site were also made. Mutations were introduced as detailed in the “Experimental Procedures” and mutant and wild-type proteins were expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography as illustrated in Fig. 5A. Each mutant showed only one immunoreactive band at the position of the wild-type enzyme except for the mutant where the N terminus was deleted, which displayed a slightly higher electrophoretic mobility (Fig. 5B). The purified enzyme preparations were used to test the effects of the mutations on catalytic activities and secondary structures of the enzymes.

The model predicts that substrate CoA chain docking to the CCoAOMT protein involves ionic binding between negatively charged substrate phosphate groups and either Arg-220, on one hand, or Arg-202, Lys-199, and Arg-198 on the other hand. (Fig. 4). To discriminate between these two possibilities, we produced two mutated proteins, one with Arg-220 changed to Thr and a second in which Arg-202, Lys-199, and Arg-198 were simultaneously substituted by Thr, Thr, and Ser, respectively. As shown in Fig. 6, the triple mutation did not affect enzyme activity, thus ruling out a role for one of the three mutated residues in catalytic activity. On the contrary, the replacement of Arg-220 by Thr resulted in the total loss of enzyme activity (Fig. 6), thus demonstrating that the positively charged Arg-220 in the wild protein is responsible for the electrostatic at-

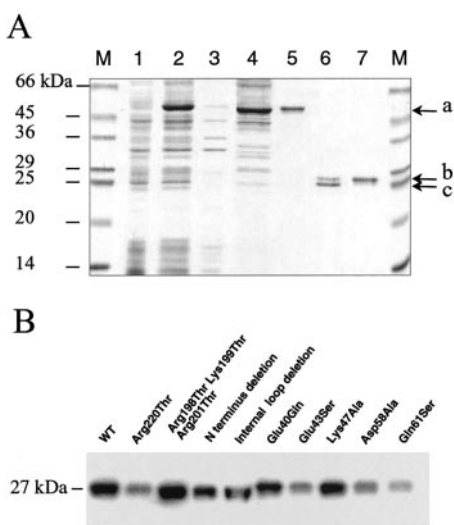


FIG. 5. Purification and immunological characterization of wild-type and mutant enzymes expressed in *E. coli*. A, bacterial protein extracts prepared and purified as described under “Experimental Procedures” were analyzed by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels and Coomassie Blue staining. A typical purification process is illustrated. *Band a* accumulated in crude extracts of induced cells (*lane 2*) and not in non-induced cells (*lane 1*) and corresponds to GST-CCoAOMT fusion protein. The fusion protein was found in soluble protein fraction (*lane 4*) but not in insoluble protein fraction (*lane 3*). The GST-CCoAOMT protein was purified by affinity chromatography on glutathione-agarose (*lane 5*) and cleaved by thrombin (*lane 6*). Purified CCoAOMT (*lane 7*, *band b*) was obtained after an additional run through the affinity column that retained the GST protein (*band c*), and was used for biochemical studies. B, the different enzymes were immunoblotted with polyclonal antibodies raised against the wild-type protein. The nature of mutations introduced into recombinant proteins is indicated above each *lane*.

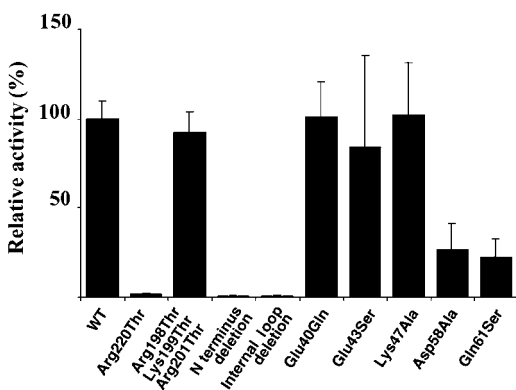


FIG. 6. Specific CCoAOMT activities of wild-type and mutant enzymes. Enzyme activities were measured for reaction with caffeoyl-CoA and are expressed relative to the activity of wild-type enzyme.

traction of the caffeoyl-CoA substrate and is not dispensable for enzyme activity. As shown in Fig. 7, other interactions could be inferred from CoA moiety docking in the Arg-220 pocket to refine the position of ribose and adenine. In particular, a few charged or polar residues, Glu-40, Glu-43, Lys-47, Asp-58, or Gln-61 could interact with the nitrogen atoms of the adenine or the oxygen atoms of the phosphate and pyrophosphate groups (Fig. 7). These putatively interacting residues were mutated, and the effects of the mutations on enzymatic activity appeared sharply different (Fig. 6). None of the individual changes of Glu-40 for Gln, Glu-43 for Ser, or Lys-47 for Ala substantially affected the activity level. In contrast, mutation of the Asp-58 residue into Ala and that of Gln-61 into Ser resulted in enzymes with significantly decreased activity (Fig. 6). These data suggest that Asp-58 and Gln-61 indeed interact with the base

as shown in Fig. 7A. The residual activity measured for these latter mutants was high enough to allow the determination of substrate affinity values. The mutations markedly decreased enzyme affinity since K_m values of $640 \pm 350 \mu\text{M}$ and $290 \pm 110 \mu\text{M}$ were found for the D58A and Q61S mutants, respectively, compared with the wild-type value of $27.5 \pm 4.5 \mu\text{M}$ (data not shown).

When the N-terminal extension or the Asn-186—Ala-191 internal loop was deleted, the protein completely lost its catalytic activity (Fig. 6). These results demonstrate that these sequences specific to CCoAOMTs are needed for the activity of plant enzymes while animal CatOMTs are functional in their absence (Fig. 3).

Circular Dichroism Spectra of the Wild-type and Mutant Enzymes—Circular dichroism (CD) spectra of the recombinant enzymes that were altered in catalytic activity were monitored to ascertain whether the corresponding mutations could cause important conformational changes in the protein (Fig. 8). The CD spectra of substitution mutants with decreased enzyme activity, namely R220T, D58A, and Q61S mutants, are virtually superimposable (within the experimental precision) with both that of the wild type and that of the 6-residue deletion mutant resulting from the removal of Asn-186 to Ala-191. The two distinct minima at 208 nm and 222 nm are in good agreement with the $\alpha+\beta$ class of the protein. Interestingly, deletion of the 16 N-terminal amino acids gives rise to a small but significant increase of the CD signal intensity at 208 nm. Our results indicate that none of these mutations causes a major change in the secondary structure of the enzyme despite the alteration of catalytic activity. As shown in Fig. 8B, the addition of caffeoyl-CoA substrate to the wild-type enzyme in the presence of AdoMet and Mg^{2+} cofactors induces a decrease in the CD signal at 208 nm characteristic of a destabilization of the β -strand component. Similar behavior was observed for all the substitution mutants under the same conditions (Fig. 8C). Interestingly a more pronounced effect of β -strand destabilization was detected in the case of the Asn-186—Ala-191 internal loop deletion mutant. By contrast, the N-terminal deletion induced a stabilization of the β -strand component. These data suggest a particular role for the N-terminal amino acid sequence in the enzyme-caffeoyl-CoA interaction.

DISCUSSION

The structural identity between the active sites of CatOMTs of animals and CCoAOMTs of plants enabled us to construct a homology model for the plant enzyme based on the crystal structure of rat CatOMT (26). Amino acids interacting with the AdoMet cosubstrate as well as those binding the Mg^{2+} cofactor that interacts with the ortho dihydroxyls of the aromatic substrate appear to be well conserved, indicating a similar molecular mechanism for *O*-methylation by the two enzymes. It is likely that for CCoAOMTs as for CatOMTs an $\text{S}_{\text{N}}2$ -type mechanism allows the biomolecular transfer of the methyl group of AdoMet to the oxygen of the hydroxyl situated in the meta position from the lateral chain. The Mg^{2+} ion probably lowers the $\text{p}K_a$ of this hydroxyl group whereas the proton of the other hydroxyl is stabilized by the negative charge of Glu 199 carboxyl group. The phenolate ion makes a direct nucleophilic attack on the electron-deficient methyl of AdoMet (26). The binding of CoA moiety to the enzyme is also likely to contribute to the exact positioning of the substrate and thus to the strict preference of the enzyme for *O*-methylation in the meta position. We have demonstrated that the para methylation product, isoferuloyl-CoA characterized as isoferulic acid by TLC after saponification of the incubation solution (not shown), represented less than 1–2% of the total methylated reaction products. It is interesting to note that a similar preference for the

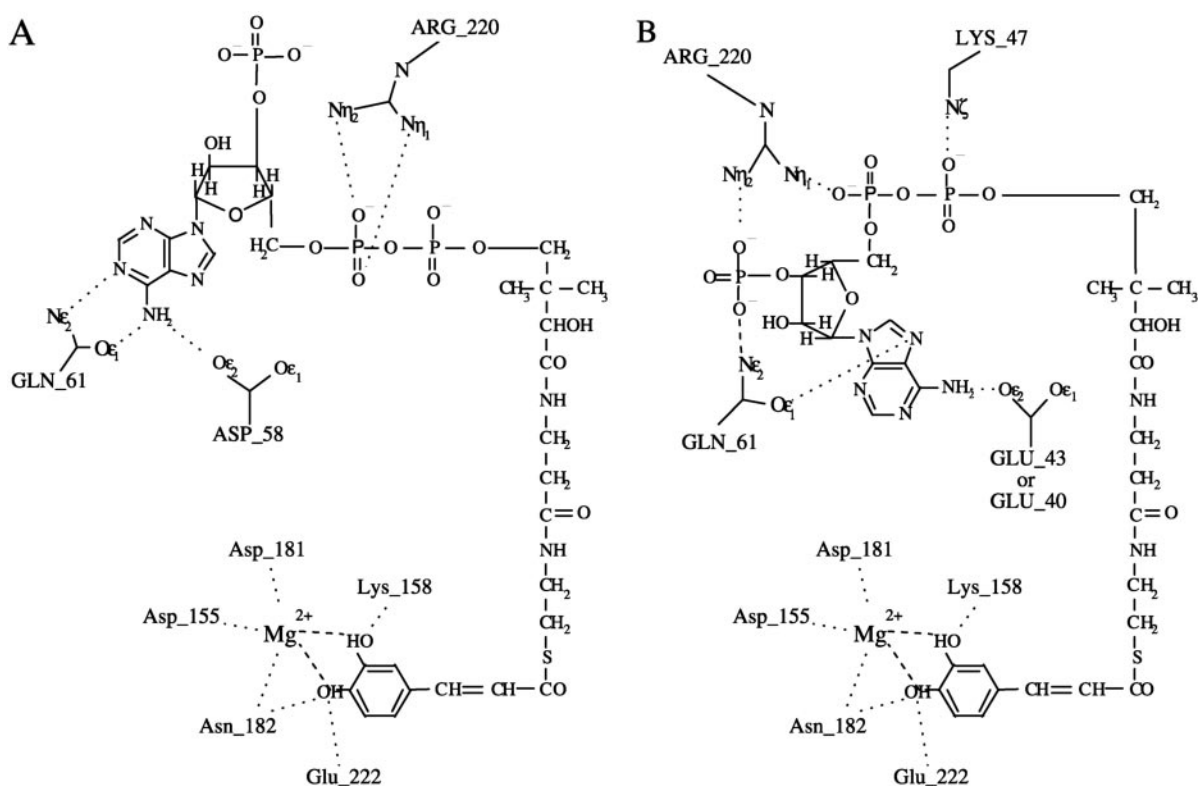


FIG. 7. **Schematic representation showing two possible interaction patterns of ribose and adenine moieties with the Arg-220 pocket.** The phenolic ring interacting with Mg²⁺ ion and Asp-155, Lys-158, Asp-181, Asp-182, and Glu-222 was kept in fixed position and possible interactions were deduced from the contacts seen in 1VID. The rest of the caffeoyl-CoA molecule was built in such a way that it interacts with the Arg-220 pocket. Two different conformations are shown that favor contacts of the sugar and the base either in A (with Asp-58 and Gln-61) or in B (with Lys-47, Glu-43, or Glu-40 and Gln-61).

meta position has been demonstrated for tobacco COMT I, which methylates free caffeic acid (18, 39). Modeling of the *O*-methylated dopamine in the active site of CatOMT showed that, when a methyl group transfer is performed, Lys-144 will repel the *O*-methyl ether group, thus favoring dissociation from the enzyme (26). By analogy, we propose that a similar mechanism operates in CCoAOMT after formation of the feruloyl-CoA product.

CatOMT and CCoAOMT have strikingly different substrate specificities. Catechol is a substrate for the former and not for the latter whereas both enzymes methylate caffeoyl-CoA (Fig. 3). Trp-38 has been suggested to play a crucial role in CatOMT activity by establishing hydrophobic contact with the aromatic ring (26). All plant CCoAOMTs have an Asn residue in that position (Fig. 2) but its substitution by a Trp residue by site-directed mutagenesis of tobacco CCoAOMT was not sufficient to confer the capability to methylate catechol (data not shown). Other structural differences thus may account for the distinct substrate preferences between plant and animal enzymes. For instance, tobacco CCoAOMT has a N terminus and one internal loop (Asn-186 to Ala-191) that are absent in CatOMT. Deletion of these parts of the CCoAOMT protein has been shown to abolish activity and this is probably not due to changes in secondary structure of the mutants, as indicated by the circular dichroism data (Fig. 8A). However, the conformation changes induced by caffeoyl-CoA and revealed by CD in all the other enzymes were lost when the protein N terminus was deleted. It is worth noting here that pig CatOMT methylates caffeoyl-CoA despite the absence of the N-terminal extension of the protein (Fig. 2), thus indicating that specific structural features of CatOMT allows substrate binding. The fact that the animal enzyme has the capability to methylate caffeic acid and various derivatives including the CoA ester, which are products of

plant secondary metabolism, was unexpected. These results may indicate that, in animals, CatOMT activity, which occurs in different tissues (20, 21), participate in the metabolism of plant products ingested in food.

Among the phenolic substrates, catechol ($M_r = 110$) and caffeoyl-CoA ($M_r = 929$) have quite different sizes due to the long lateral chain present in the CoA ester (Fig. 3). Thus the CoA moiety offers the possibility of additional interactions with the protein. Biochemical studies using truncated caffeoyl-CoA as putative substrate for CCoAOMT demonstrated the crucial role of 5'-phosphoadenosine moiety in enzyme binding. Furthermore, modeling of caffeoyl-CoA in the active site revealed several putative binding sites for the CoA moiety. Mutational analysis of the amino acid residues presumed to participate in the substrate binding showed the importance of several of them for catalytic activity. Arg-220 is probably involved in electrostatic interactions with the negatively charged phosphodiester bond in the CoA ester molecule while Asp-58 and Gln-61 are probably involved in binding of the adenine base. However, whereas substitution of Arg-220 totally eliminated enzymatic activity, the mutations of Asp-58 and Gln-61 change the kinetic properties of the enzyme, which was still active although less efficient (Fig. 6). Our data indicate an essential role of the coenzyme A moiety for caffeoyl-CoA recognition by CCoAOMT and catalytic activity, thus explaining the strict specificity of the enzyme for hydroxycinnamoyl-CoA esters (18). The recent elucidation of the structures of chalcone and isoflavone OMTs has shown that, in another group of plant OMTs, protein dimerization plays an important role in substrate discrimination since the dimer interface contributes to the substrate binding site (19). Similarly, the homo- or heterodimerization of OMT isoforms involved in alkaloid berberine biosynthesis has been shown to give rise to enzymes accepting new substrates

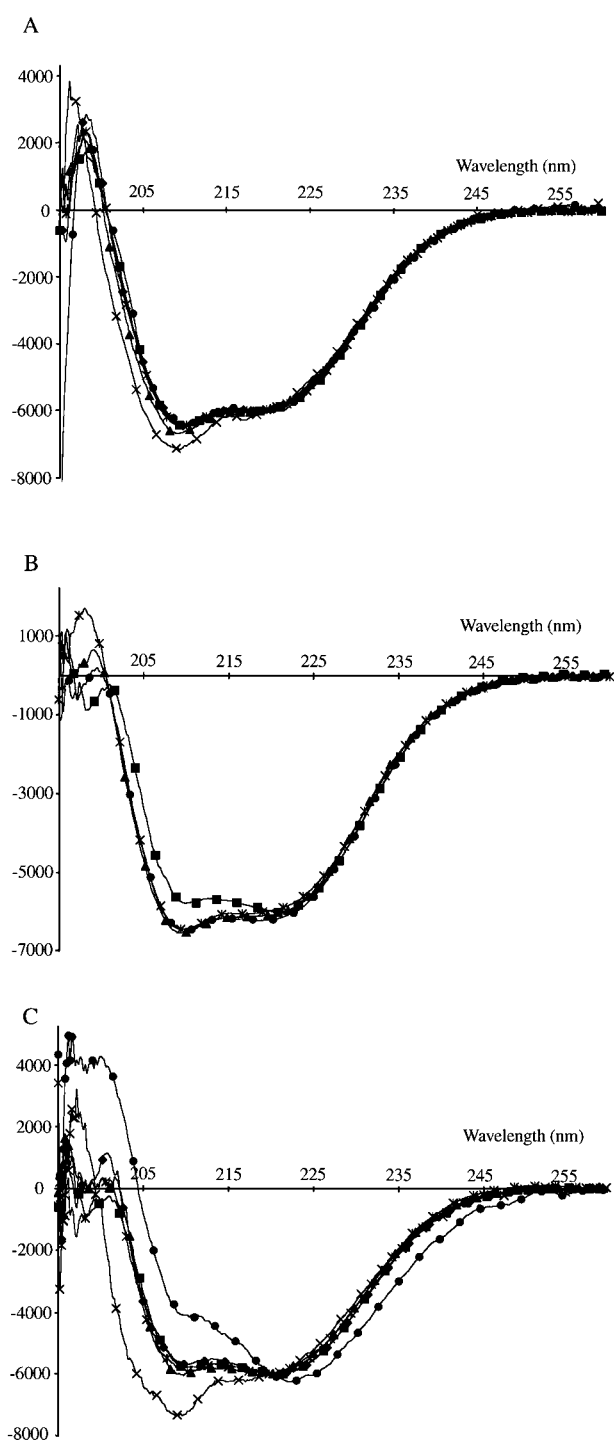


FIG. 8. Circular dichroism spectra of the wild-type and mutant CCoAOMT enzymes. A, CD spectra of wild-type enzyme (■) and R220T (◆), D58A (◐), Q61S (▲), Asn-186—Ala-191 deletion (○) and N-terminal deletion (x) mutants are presented. B, CD spectra of the wild-type protein alone (◐) or in the presence of 200 μM Mg^{2+} (▲), or 200 μM Mg^{2+} and 40 μM AdoMet (○), or 200 μM Mg^{2+} , 40 μM AdoMet and 40 μM caffeoyl-CoA (■). C, CD spectra were recorded in the presence of 200 μM Mg^{2+} , 40 μM AdoMet, and 40 μM caffeoyl-CoA for wild-type and mutant proteins. Symbols are as in A.

(40). In contrast, CCoAOMTs behave as monomers in aqueous solutions (data not shown) and their exquisite selectivity for hydroxycinnamoyl esters of coenzyme A occurs through interactions with the CoA moiety of the molecule.

Acknowledgments—We thank Pierrette Geoffroy for the synthesis of caffeoyl-CoA. We are grateful to Dr. Luc Moulinier and Dr. Dino Moras (IGBMC, Strasbourg) for their help in the early phase of this project. Dr. Kenneth Richards (IBMP) is gratefully acknowledged for his careful reading of the manuscript.

REFERENCES

- Dixon, R. A., and Paiva, N. L. (1995) *Plant Cell* **7**, 1085–1097
- Douglas, C. J. (1996) *Trends Plant. Sci.* **1**, 171–178
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., and Boerjan, W. (1998) *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 125–197
- Boudet, A. M., Lapiere, C., and Grima-Pettenati, J. (1995) *New Phytol.* **129**, 203–236
- Burns, J., Gardner, P., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M., Lean, M., Duthie, G., and Crozier, A. (2000) *J. Agric. Food Chem.* **48**, 220–230
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G., Slowing, K., Thomas, C., Beecher, C., Fong, H., Farnsworth, N., Kinghorn, A., Mehta, R., Moon, R., and Pezzuto, J. (1997) *Science* **275**, 218–220
- Kahkonen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T., and Heinonen, M. (1999) *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3954–3962
- Bugos, R. C., Chiang, V. L., and Campbell, W. H. (1991) *Plant Mol. Biol.* **17**, 1203–1215
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A., and Bantignies, B. (1998) *Plant Mol. Biol.* **36**, 1–10
- Jaeck, E., Dumas, B., Geoffroy, P., Favet, N., Inze, D., Van Montagu, M., Fritig, B., and Legrand, M. (1992) *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 294–300
- Joshi, C. P., and Chiang, V. L. (1998) *Plant Mol. Biol.* **37**, 663–674
- Pellegrini, L. O. G., Geoffroy, P., Fritig, B., and Legrand, M. (1993) *Plant Physiol.* **103**, 509–517
- Schmitt, D., Pakush, A.-E., and Matern, U. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17416–17423
- Ye, Z.-H., Kneusel, R. E., Matern, U., and Varner, J. E. (1994) *Plant Cell* **6**, 1427–1439
- Chen, C., Meyermans, H., Burggraef, B., De Rycke, R., Inoue, K., De Vlesschauer, V., Steenackers, M., Van Montagu, M., Engler, G., and Boerjan, W. (2000) *Plant Physiol.* **123**, 853–867
- Inoue, K., Sewalt, V. J. H., Ballance, G. M., Ni, W., Stürtzer, C., and Dixon, R. A. (1998) *Plant Physiol.* **117**, 761–770
- Martz, F., Maury, S., Pinçon, G., and Legrand, M. (1998) *Plant Mol. Biol.* **36**, 427–437
- Maury, S., Geoffroy, P., and Legrand, M. (1999) *Plant Physiol.* **121**, 215–224
- Zubieta, C., He, X.-Z., Dixon, R. A., and Noel, J. P. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 271–279
- Assicot, M., and Bohuon, C. (1970) *Eur. J. Biochem.* **12**, 490–495
- Axelrod, J., and Tomchick, R. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 702–705
- Bonifati, V., and Meco, G. (1999) *Pharmacol. Ther.* **81**, 1–36
- Kaakkola, S. (2000) *Drugs* **59**, 1223–1250
- Ruottinen, H., and Rinne, U. (1998) *J. Neurol.* **245**, 25–34
- Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I., and Bourne, P. (2000) *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242
- Vidgren, J., Svensson, L. A., and Liljas, A. (1994) *Nature* **368**, 354–357
- Bugl, H., Fauman, E., Stacker, B., Zheng, F., Kushner, S., Saper, M., Bardwell, J., and Jakob, U. (2000) *Mol. Cell* **6**, 349–360
- Schluckebier, G., Kozak, M., Bleimling, N., Weinhold, E., and Saenger, W. (1997) *J. Mol. Biol.* **265**, 56–67
- Skinner, M., Puvathingal, J., Wajter, R., and Friedman, A. (2000) *Structure* **8**, 1189–1201
- Zhang, X., Zhou, L., and Cheng, X. (2000) *EMBO J.* **19**, 3509–3519
- Sänger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–5467
- Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. (1990) *Mol. Plant-Microbe Interact* **3**, 327–333
- Stöckigt, J., and Zenk, M. H. (1975) *Z. Naturforsch* **30c**, 352–358
- Negrel, J., and Smith, T. A. (1984) *Phytochemistry* **23**, 31–34
- Lüderitz, T., Schatz, G., and Grisebach, H. (1982) *Eur. J. Biochem.* **123**, 583–586
- Sali, A., and Blundell, T. L. (1993) *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815
- Jones, T. A., Bergdoll, M., and Kjeldgaard, M. (1989) in *Crystallographic Computing and Modelling Methods in Macromolecular Design* (Buggs, C., and Ealick, S., eds) pp. 189–195, Springer, NY
- Collazo, P., Montoliu, L., Puigdomenech, P., and Rigau, J. (1992) *Plant Mol. Biol.* **20**, 857–867
- Legrand, M., Fritig, B., and Hirth, L. (1978) *Planta* **144**, 101–108
- Frick, S., and Kutcan, T. M. (1999) *Plant J.* **17**, 329–339

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'acyltransférase de tabac (HCT) et le métabolisme des phénylpropanoïdes 125

Stratégie d'isolement de nouvelles acyltransférases impliquées dans
le métabolisme des phénylpropanoïdes : approche phylogénétique chez
Arabidopsis 131

Approches bioinformatiques 133

Discussion et perspectives

Le métabolisme des phénylpropanoïdes mène à la synthèse de nombreux composés phénoliques dont les fonctions, comme cela a été montré dans ce mémoire, sont variées. La lignine, notamment, est présente chez la majorité des espèces appartenant au règne végétal. Elle constitue la deuxième source de carbone à la surface de la terre après la cellulose. Chez les Ptéridophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes, la lignine par ses propriétés physico-chimiques assure rigidité aux parois cellulaires végétales, imperméabilité aux tissus conducteurs et joue un rôle dans les mécanismes passifs et actifs de résistance des plantes aux agents pathogènes. Outre son intérêt d'un point de vue fondamental, la compréhension de la voie de biosynthèse de la lignine s'avère importante d'un point de vue appliqué : elle devrait permettre d'élaborer de nouvelles stratégies permettant de modifier les propriétés physiques et chimiques de ce polymère dans le cadre d'applications industrielles et agroalimentaires. Ces dernières années, les connaissances sur le métabolisme des phénylpropanoïdes et plus particulièrement sur la voie de biosynthèse de la lignine ont progressé de manière remarquable grâce notamment au génie génétique, aux approches biochimiques et à la génomique. Parmi ces avancées, il a été montré que le flux métabolique, *in planta*, conduisant aux monomères de lignine n'était pas aussi simple qu'on pouvait le penser. Les esters de CoA, puis plus récemment, les esters quinique et shikimique d'acides hydroxycinnamiques, se sont avérés être des intermédiaires métaboliques essentiels.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a contribué à mieux comprendre la voie de biosynthèse de la lignine chez les *Nicotianées* en caractérisant dans un premier temps une nouvelle enzyme à activité acyltransférase, impliquée dans la voie de biosynthèse de la lignine. Nous avons démontré que cette enzyme à activité HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinique hydroxycinnamoyl Transférase (HCT) catalysait la synthèse des esters shikimique et quinique d'acide *p*-coumarique, considérés comme de nouveaux intermédiaires métaboliques, depuis le clonage de la cinnamate 3-hydroxylase (C3H) (Schoch *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2001a, b). En effet, ce cytochrome P450 catalyse la réaction d'hydroxylation en position 3 du noyau aromatique en utilisant préférentiellement comme substrat le *p*-coumaroyl-shikimique ou *p*-coumaroyl-quinique. De plus, le rôle physiologique de l'enzyme HCT dans la lignification a été démontré *in planta* par une approche de « Virus Induced Gene Silencing » (VIGS). Un autre résultat majeur est que cette enzyme semble directement impliquée dans le métabolisme de l'acide chlorogénique (CGA). Enfin, l'expression du gène *HCT* est également induite lors des réactions de défense.

Parallèlement à cette découverte, nous avons réalisé des études de type « structure/fonction » avec pour objectif de déterminer la base structurale conférant la

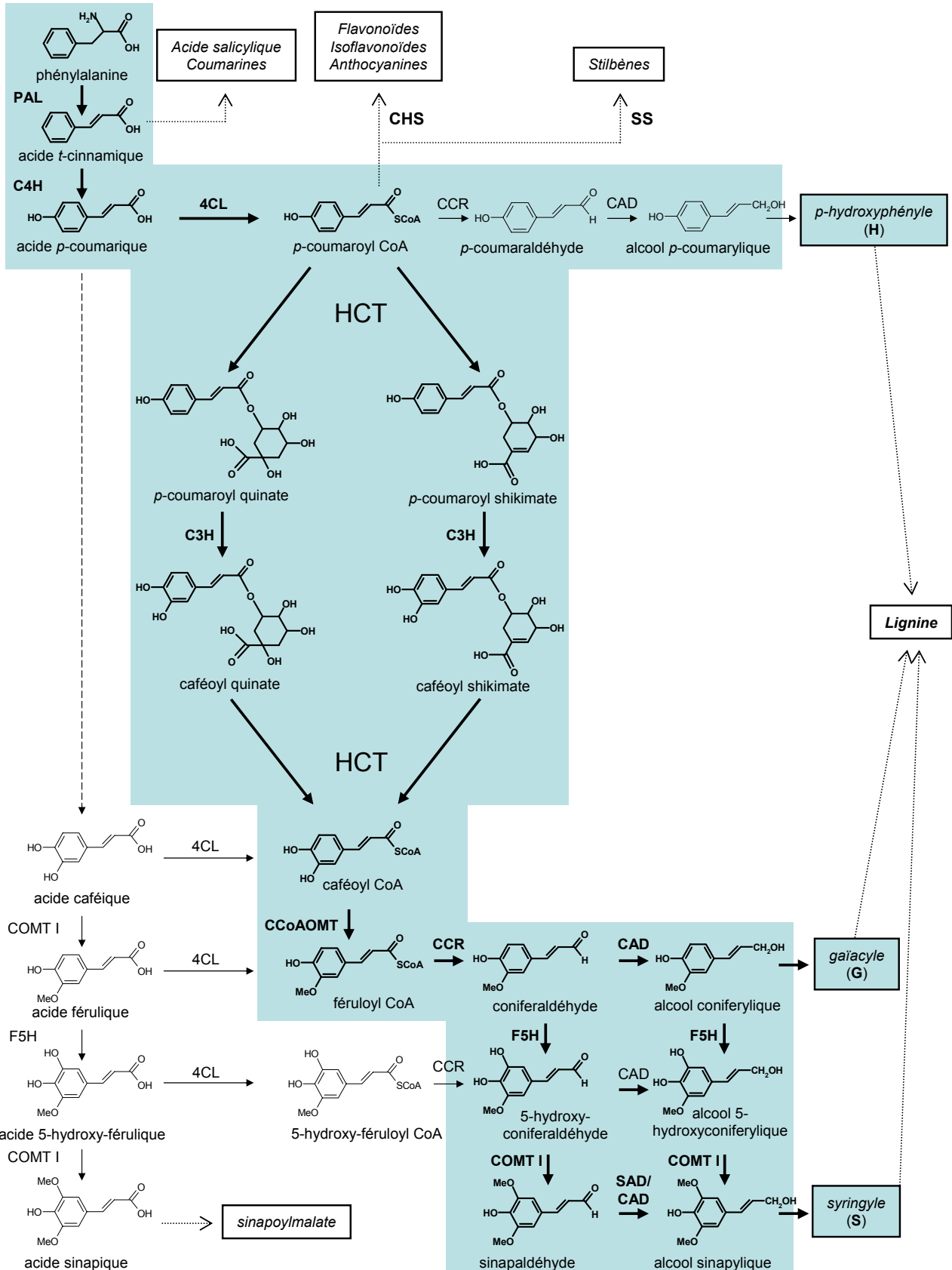


Figure A. Le métabolisme des phénylpropanoïdes et la voie de biosynthèse de la lignine. Les abréviations de chaque enzyme sont indiquées Fig. 19 et 34. HCT, hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transférase.

spécificité de substrat de la caféoyl-CoA OMT (CCoAOMT) vis-à-vis des esters de CoA. Des approches bioinformatique et de mutagenèse dirigée, couplées à des études biochimiques, nous ont permis de déterminer des acides aminés du site actif de la CCoAOMT responsables de la reconnaissance spécifique de la chaîne latérale de CoA de l'ester.

L'acyltransférase de tabac (HCT) et le métabolisme des phénylpropanoïdes

Spécificité de substrat de l'enzyme HCT

Les études biochimiques réalisées sur la protéine HCT recombinante démontre *in vitro* une spécificité de substrat relativement étroite vis-à-vis des accepteurs. En effet, l'enzyme se montre active uniquement vis-à-vis de l'acide shikimique et de l'acide quinique. L'activité n'a pas été détectée sur d'autres intermédiaires de la voie du shikimate tels que l'antranilate, ni sur d'autres accepteurs potentiels tels que le glucose, les polyamines ou encore l'acide malique. Concernant la spécificité de substrat d'HCT vis-à-vis des donneurs d'acyles au squelette phénylpropane, elle semble un peu plus large. L'enzyme catalyse efficacement la réaction de trans-estérification aussi bien à partir du *p*-coumaroyl-CoA que du caféoyl-CoA ou encore du cinnamoyl-CoA. Les réactions catalysées à partir des deux premiers substrats conduisent, respectivement, aux substrats de la C3H et à l'acide chlorogénique (CGA). L'activité de transfert du groupement cinnamoyl sur les acides shikimique ou quinique impliquerait tout d'abord l'existence d'une 4CL active vis-à-vis de l'acide cinnamique et que la C4H (ou une autre enzyme) accepterait comme substrat les esters shikimique ou quinique d'acide cinnamique pour former des esters d'acide *p*-coumarique. De telles activités n'ont pour l'instant pas été démontrées. Ces données vont dans le sens d'une spécificité de substrat très étroite des enzymes du métabolisme catalysant les étapes précoces, ce qui permet la synthèse de composés spécifiques dans une condition donnée ou dans certaines cellules et/ou tissus. A l'inverse, les enzymes plus en aval dans ces voies, comme les glucosyltransférases ou les *O*-méthyltransférases, ont une spécificité de substrat plus large, qui pourrait permettre à la plante de conjuguer plusieurs types de métabolites secondaires de structure proche synthétisés en réponse à différentes conditions environnementales (Vogt et Jones, 2000).

Ainsi, nos données biochimiques démontrent qu'HCT semble spécifiquement impliquée dans la synthèse des substrats de la C3H (**Fig. A**). La fonction de l'acyltransférase dans la biosynthèse de la lignine a été démontrée *in planta*, alors que son rôle dans le métabolisme du CGA reste à préciser et sera discuté ultérieurement.

L'analyse phylogénétique des gènes d'*Arabidopsis*, présentée plus loin, montre que la protéine la plus proche de celle de tabac présente 79 % d'identité et 87 % de similarité; cette conservation de structure entre les deux protéines recombinantes d'*Arabidopsis* et de tabac se

traduit par une activité enzymatique similaire (article 1). La seconde protéine d'*Arabidopsis* la plus proche de celle de l'enzyme de tabac ne présente plus que 41 % de similarité. Cette étude phylogénétique chez *Arabidopsis* ainsi que le Southern réalisé chez *N. benthamiana* révèlent la faible redondance de ce gène *HCT* chez les plantes. Ainsi, l'implication d'*HCT* dans la synthèse spécifique des substrats de la C3H et la présence d'une seule copie du gène *HCT* dans le génome d'*Arabidopsis* et de *N. benthamiana* indiquent que cette enzyme joue un rôle majeur dans le métabolisme des phénylpropanoïdes, dont la fonction semble peu redondante. Ceci pourrait expliquer le faible nombre de mutations répertoriées à l'heure actuelle et présentes dans le gène *HCT* d'*Arabidopsis* (adresses électroniques de banques de données; http://www.tmri.org/pages/collaborations/garlic_files/GarlicDescription.html; <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>; <http://genoplante.evry.inra.fr/projects/fst/DocsIntro/collection-francais.html>; <http://seeds.nottingham.ac.uk/Nasc/action.lasso?-response=browse/browse.lasso&-token.user=15112682413>). Une autre explication possible serait la létalité d'une telle mutation. Dans ce cas, d'autres approches seront à envisager pour étudier la fonction d'*HCT* au cours du développement de la plante, telles que le RNAi et l'utilisation de promoteur inductibles et / ou tissus spécifiques afin de mieux contrôler et cibler la répression du gène *HCT*.

Rôle physiologique de l'enzyme HCT

HCT appartient à la superfamille des acyltransférases dépendantes des esters de CoA « BAHD » qui catalysent la trans-estérification de groupements acyles sur des molécules de faible poids moléculaire. Chez les plantes, malgré l'extraordinaire diversité des métabolites secondaires estérifiés, les acyltransférases sont relativement peu connues et n'ont été bien caractérisées que dans quelques cas. Une partie de ce travail a permis d'identifier et de caractériser pour la première fois une acyltransférase « BAHD » impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes.

Le gène HCT et la lignification

La détermination du rôle physiologique d'*HCT* a été abordée par une approche de type « knock-out ». L'expression du gène *HCT* a été réprimée par la technique « VIGS ». Ce système s'est avéré très intéressant pour démontrer le rôle de l'enzyme dans la lignification. En effet, l'expression du gène *HCT* est affectée de manière hétérogène que ce soit au niveau d'un lot de plantes, au sein d'une même plante, de différents tissus et surtout au niveau cellulaire. Cette dernière caractéristique nous a permis d'analyser des coupes transversales de tiges de *N. benthamiana* possédant à la fois des zones exprimant l'enzyme *HCT* et d'autres, sous l'effet du « VIGS », réprimées pour celle-ci. Ainsi, nous avons pu, grâce à des approches

histochimiques et immunologiques, étudier *in planta*, sur une même plante, au sein d'un même tissu, les conséquences de la répression du gène *HCT* sur la lignification des tissus conducteurs par rapport aux zones « sauvages ». Ces plantes affectées dans l'expression d'*HCT* synthétisent moins de lignine (réduction d'environ 15%); ce résultat est en accord avec d'autres études qui ont montré que l'inhibition de l'expression de gènes du métabolisme des phénylpropanoïdes, tels que ceux codant pour la *PAL* et la *C3H*, conduit également à une teneur en lignine plus faible (Korth *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2001a). L'effet sur la composition de la lignine synthétisée s'avère plus surprenant puisque, sur les deux monolignols situés en aval de la réaction catalysée par *HCT*, seule la proportion en unités S est diminuée, alors que celle des unités G n'est pas ou peu affectée. Ce type d'observation, déjà réalisé pour des plantes transgéniques affectées par exemple dans l'expression de la *C4H* (Blee *et al.*, 2001), n'a pas trouvé pour l'instant d'explications précises. Une explication possible serait l'existence de complexes enzymatiques au niveau des membranes du réticulum endoplasmique (RE). En effet, la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes fait intervenir trois cytochromes P450 membranaires localisés au niveau du RE. Grâce à des approches d'immunolocalisation, d'autres enzymes du métabolisme, dont la *PAL*, ont été localisées au niveau de ces membranes, bien que ces enzymes soient hydrosolubles. Ainsi, certaines de ces enzymes seraient capables d'interagir entre elles pour former des complexes enzymatiques situés au niveau du RE, les cytochromes P450 servant peut-être de point d'ancrage. Ce type de regroupement, notamment d'enzymes intervenant de façon séquentielle (exemple : *PAL* / *C4H* / *HCT* / *C3H* / *HCT* / *CCoAOMT*), permettrait d'isoler un flux métabolique. Par exemple, la phénylalanine serait métabolisée par la *PAL*, puis le produit correspondant, l'acide *t*-cinnamique, serait pris directement en charge par la *C4H* et ainsi de suite. Ce type d'organisation cellulaire présente l'avantage de ne pas relarguer les intermédiaires métaboliques dans le pool général et surtout d'orienter le flux métabolique vers telle ou telle voie (flavonoïdes, unités G, unités S) en fonction de la composition du complexe enzymatique. De tels modèles ont notamment été proposés par Jaakola et Coll. (2002) pour les enzymes de la voie des flavonoïdes dans le but d'expliquer la diversité de la composition des anthocyanes et des flavonols chez les fruits rouges (myrtilles, raisins, groseilles, fraises). De plus, il a été montré *in vitro* que des fractions microsomales préparées à partir de tige de luzerne étaient capables de synthétiser à partir de caféylaldéhyde du sinapaldéhyde, ce qui implique des étapes de méthylation et d'hydroxylation au sein d'un complexe enzymatique (Guo *et al.*, 2002). C'est ce que l'on appelle encore le « channelling » et pourrait également expliquer, en outre, l'hétérogénéité de la lignine en fonction des espèces végétales, des tissus, des cellules, des parois, puisque la nature des complexes pourrait varier au cours du développement et donc influencer sur la synthèse des produits finaux.

Des expériences de localisation cellulaire et subcellulaire d'*HCT* dans différents tissus en comparaison à d'autres enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes, ainsi que des

études d'interaction protéine/protéine, permettraient d'apporter plus d'informations sur ces hypothèses. La co-expression de certaines de ces enzymes, comme par exemple la PAL, la C4H, l'HCT et la C3H chez la levure permettrait de faire de la biochimie sur des fractions totales, cytosoliques ou microsomales.

Les effets de la répression du gène *HCT* sur l'inhibition de la croissance des plantes sont essentiellement attribués à la perturbation de la synthèse de la lignine aussi bien au niveau quantitatif que qualitatif. Cependant, des études plus approfondies sur la composition des phénols solubles et pariétaux chez ces plantes permettront certainement de découvrir d'autres modifications métaboliques, en plus de la concentration en acide chlorogénique, pouvant expliquer notamment la perturbation de la morphologie des feuilles.

Le gène HCT et la voie de biosynthèse de l'acide chlorogénique (CGA)

On a démontré le rôle d'HCT dans la voie de biosynthèse de la lignine. Par contre, l'implication de cette enzyme dans la synthèse, *in vivo*, d'autres composés phénoliques et notamment du CGA reste floue.

De nombreuses études basées sur le génie génétique ont été réalisées sur les enzymes de la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes. En dehors des effets observés sur la croissance de ces plantes ou la lignification, il a souvent été noté une répercussion de la modulation de l'expression de ces gènes sur la quantité des esters d'acides hydroxycinnamiques pariétaux mais également sur la concentration des esters solubles tels que le sinapoylmalate (Ruegger et Chapple, 2001) ou encore l'acide chlorogénique. Chez les *Nicotianées*, le CGA, par son abondance, constitue un composé de référence facile à quantifier au cours du développement de la plante mais également en vue d'étudier les répercussions de la modulation de l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. La surexpression de gènes situés en amont du caféoyl-CoA (la PAL par exemple; Howles *et al.*, 1996) ou la répression de l'expression de gènes situés en aval de ce même composé (la CCR par exemple; Chabannes *et al.*, 2001b), a souvent pour effet de conduire à une augmentation de la concentration du caféoyl-quinat (CGA). Dans le premier cas, c'est l'augmentation du précurseur (caféoyl-CoA) et dans le second cas l'accumulation d'HCAs qui conduisent à l'accumulation de CGA. Cependant, dans ces travaux, seule la concentration de CGA dans la feuille a été mesurée. Dans notre cas, la répression de l'expression du gène *HCT* constitue un cas particulier pour plusieurs raisons. Tout d'abord, *in vitro*, le produit de ce gène est capable à la fois de synthétiser et d'hydrolyser le CGA. C'est-à-dire qu'HCT catalyse une réaction réversible pouvant intervenir directement dans la synthèse et la dégradation du CGA, et par conséquent HCT peut constituer, *in planta*, une enzyme clef dans la régulation du pool de ce composé. De plus, les plants de *N. benthamiana* réprimés pour le gène *HCT* présentent une augmentation spectaculaire de la concentration en

CGA au niveau des tiges, alors que parallèlement, on semble observe une diminution dans les feuilles. Ces données contradictoires sont surprenantes et constituent également un résultat important pour la compréhension de la fonction d'HCT dans le métabolisme des phénylpropanoïdes et de façon plus précise dans le métabolisme du CGA.

Ces observations suggèrent une double fonction de l'enzyme HCT. Au niveau des feuilles, HCT régulerait de façon prédominante la synthèse de CGA même si l'effet sur les pools est difficilement détectable. Le CGA serait stocké au niveau de la vacuole et constituerait une forme de stockage des composés phénoliques. Tout au long de la croissance de la plante, les tissus en cours de lignification seraient approvisionnés via les tissus phloémiens en CGA et celui-ci serait alors catabolisé par l'HCT. Cette activité permettrait de synthétiser des intermédiaires métaboliquement actifs tels que le caféoyl-CoA, destinés à la synthèse des monomères de la lignine qui sont polymérisés dans les tissus conducteurs (**Fig. A**). Cette hypothèse est appuyée par le fait que l'acide chlorogénique n'est pas substrat des différentes isoformes de CCoAOMTs ou de COMTs (Maury *et al.*, 1999). Il doit donc être transformé en caféoyl-CoA par l'HCT pour réintégrer le pool des phénylpropanoïdes « actifs ». Les phénomènes de compartimentation entre les enzymes synthétisant les intermédiaires métaboliques de la voie du shikimate (chloroplaste), les composés phénoliques (cytoplasmiques et vacuolaires) et l'enzyme HCT (cytoplasmique) pourraient expliquer que dans un cas l'équilibre soit en faveur de l'hydrolyse (dans la tige) et que dans l'autre cas cet équilibre soit orienté vers la synthèse (comme dans les feuilles) du CGA. Dans ce contexte, il apparaît intéressant de déterminer, par immunocytochimie, la localisation subcellulaire d'HCT et d'enzymes intervenant dans la voie shikimate / quinate telles que la quinate hydrolyase (paragraphe 3.4.). De plus, les mécanismes de transport des esters de composés phénoliques et notamment de l'acide chlorogénique dans la cellule et plus particulièrement dans la vacuole ne sont pas encore connus. La protéine HCT recombinante pourrait être utilisée pour synthétiser des esters quinique et shikimique d'acides *p*-coumarique et caféique radioactifs, dont le transport dans la plante entière et au niveau subcellulaire pourrait être étudié.

Les études biochimiques et fonctionnelles réalisées sur HCT ont permis de préciser le rôle des intermédiaires shikimiques et quiniques dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Ces données confirment une des caractéristiques du métabolisme secondaire chez les plantes qui concerne l'existence de voies alternatives indépendantes des esters de CoA. Ces voies font intervenir des composés activés par leur estérification sur une molécule de glucose, d'acide quinique ou shikimique. Chez les Brassicacées par exemple, le 1-*O*-sinapoylglucose constitue le précurseur du sinapoylmalate et de la sinapoylcholine, des composés jouant respectivement le rôle d'écran anti-U.V. des feuilles et de substances de réserves des graines. Des mutants déficients en sinapoylmalate se caractérisent par l'accumulation de son précurseur, le

sinapoylglucose (Lehfeldt *et al.*, 2000). Dans le cas du CGA, on connaît deux voies de biosynthèse probables, l'une impliquant chez le tabac des esters de CoA (Stöckigt et Zenk, 1974), et l'autre dépendante du 1-*O*-caféoylglucose chez la patate douce (Villegas et Kojima, 1986). Nos études ont permis de démontrer que chez le tabac, HCT pourrait être une enzyme clef de la biosynthèse du CGA à partir des esters de CoA. L'utilisation de CGA marqué sur l'acide quinique permettrait de mieux comprendre le turn-over du CGA, qu'il faudrait comparer au profil d'expression du gène *HCT*.

Le gène HCT et les mécanismes de défense des plantes

Le patho-système étudié au laboratoire est *Nicotiana tabacum* Samsun NN / Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT). Après infection, la plante développe une réaction d'hypersensibilité (RH), l'un des mécanismes de résistance les plus efficaces. Des études préliminaires ont permis de montrer que la RH conduit à l'induction de l'activité HCT, avec en parallèle une augmentation de la concentration en CGA dans les feuilles. A notre connaissance, peu d'acyltransférases inductibles par des stress biotiques ou abiotiques ont été identifiées. Seule la protéine HCBT d'œillet est inductible par des agents pathogènes et conduit à la synthèse de molécules aux propriétés antimicrobiennes, les dianthramides (Yang *et al.*, 1998).

L'induction de l'activité HCT lors de la RH indique un rôle de cette enzyme, comme beaucoup d'autres intervenant dans le métabolisme des phénylpropanoïdes (Dixon et Paiva, 1995), dans les réactions de défense des plantes aux agents pathogènes. Ceci suggère une régulation coordonnée des enzymes de ce métabolisme qui conduit à la synthèse de composés aux propriétés antimicrobiennes tels que les coumarines ou encore au renforcement pariétal grâce à l'incorporation de composés phénoliques. Parallèlement à cette induction, nous avons confirmé d'autres travaux selon lesquels la synthèse de CGA est stimulée lors de la RH et conduit à son accumulation à proximité des lésions nécrotiques (Fritig *et al.*, 1972; Tanguy et Martin, 1972). La capacité d'HCT de synthétiser *in vitro* le CGA fait de cette enzyme un candidat sérieux pour contrôler le pool du composé phénolique soluble le plus abondant chez certaines plantes. La fonction du CGA lors de stress environnementaux reste floue. Ses propriétés antioxydantes pourraient en faire un métabolite piègeur des formes réactives de l'oxygène, notamment lors de stress abiotiques connus pour générer des formes activées de l'oxygène (par exemple, traitement par l'ozone). Cependant, peu d'études se sont intéressées au rôle de la voie métabolique des phénylpropanoïdes dans la réponse des plantes au stress oxydatif, bien que les composés phénoliques soient bien connus en pharmacologie pour leurs propriétés antioxydantes *in vitro* (Rice-Evans *et al.*, 1997). Récemment un rôle nouveau pour les composés phénoliques, plus particulièrement pour la scopolétine, comme piègeurs de formes réactives de l'oxygène lors de la RH a été proposé (Chong *et al.*, 2002). Chez *N.*

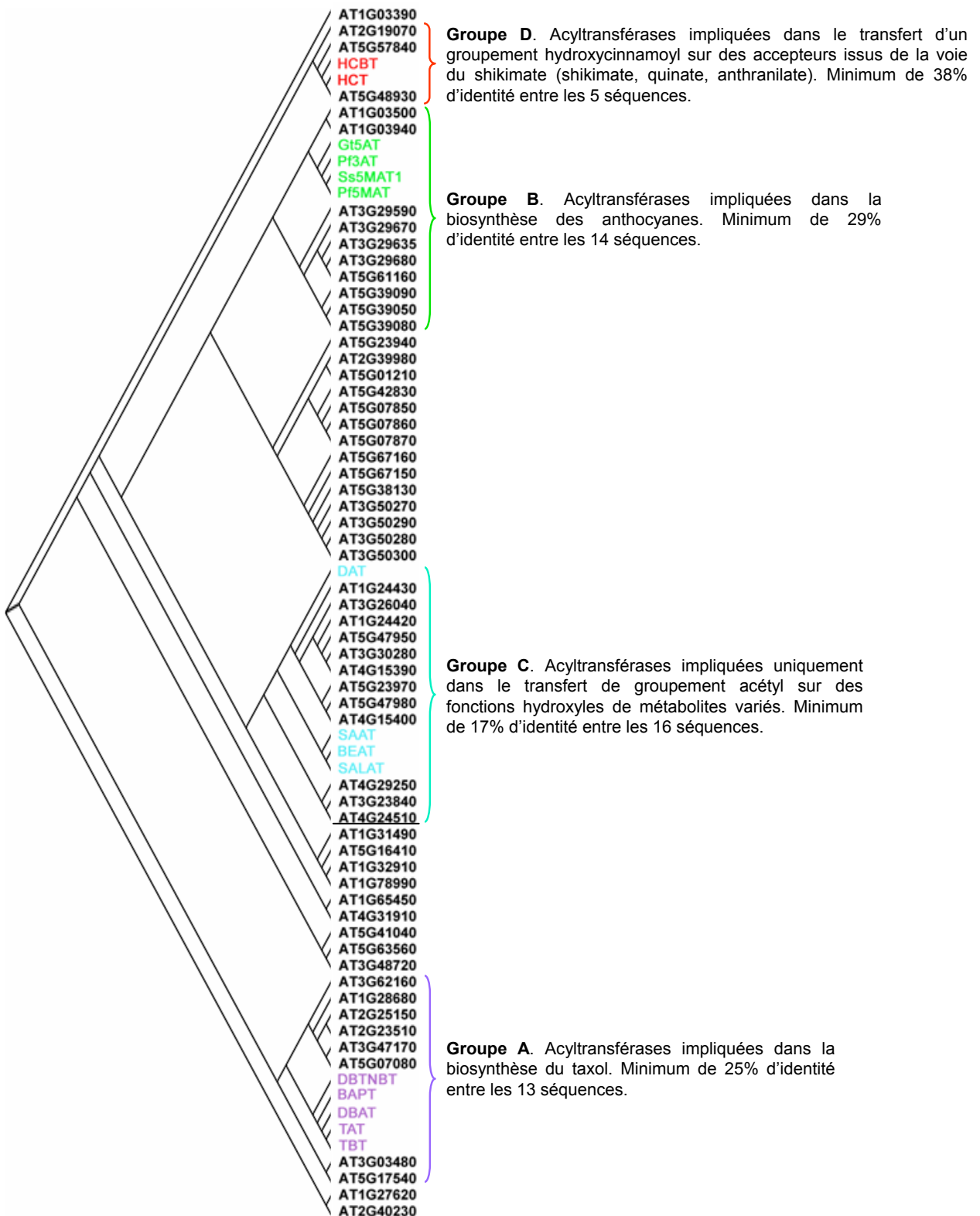


Figure B. Arbre phylogénétique représentant, sous forme de groupes fonctionnels, les 59 acyltransférases putatives d'*Arabidopsis* (en noir) et 15 acyltransférases caractérisées biochimiquement chez différentes espèces végétales (en couleur). Ces 74 protéines présentent toutes les deux motifs caractéristiques (HxxxD et DFGWG) des acyltransférases appartenant à la superfamille « BAHD ». Parmi les 59 acyltransférases d'*Arabidopsis* une seule avait été caractérisée. Il s'agit du gène At4g24510 (*CER2*) codant pour une protéine intervenant dans la synthèse de la cire épicuticulaire. La numérotation des groupes fonctionnels (A à D) reprend la nomenclature de l'article 1. Le nom précis de chacune des enzymes caractérisées est indiqué Fig.9 de l'article 1 et Fig. I 11 à I 15. Le programme utilisé pour l'alignement de séquence est ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) et l'arbre phylogénétique a été réalisé à partir du logiciel TreeView.

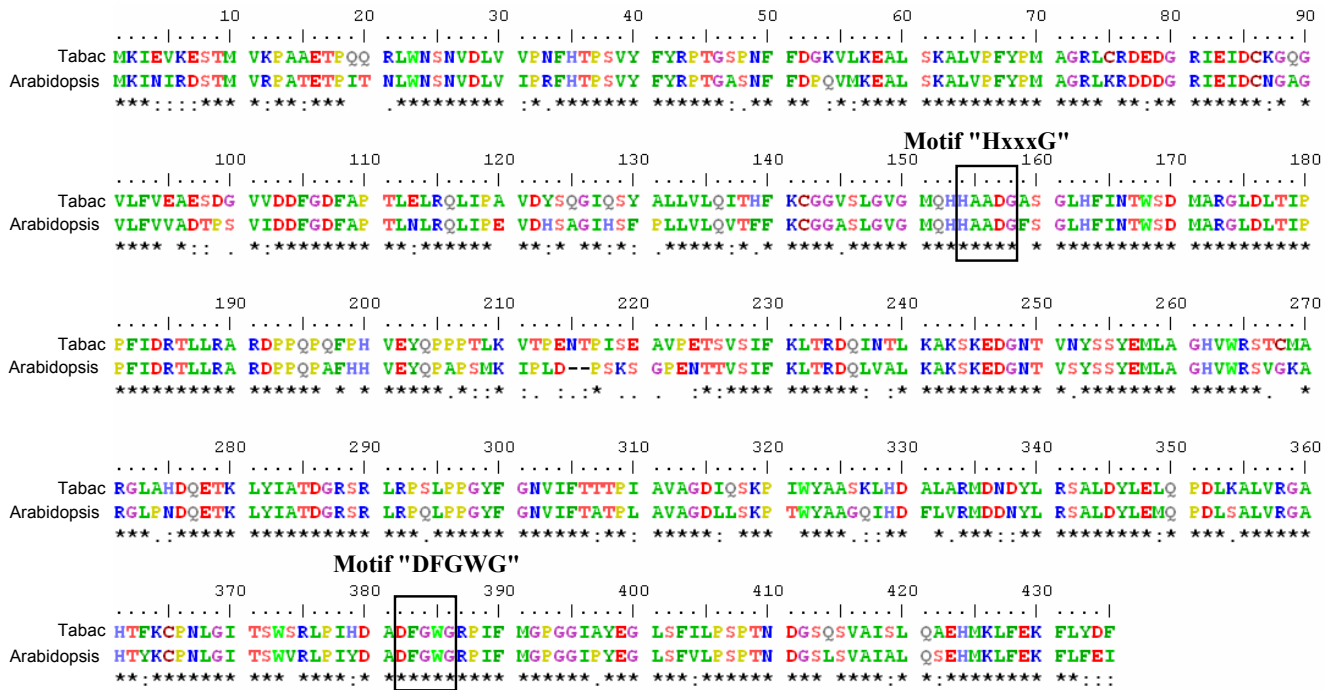


Figure C. Aligement des séquences protéiques entre l'acyltransférase de tabac (HCT; numéro d'accèsion, Z84383) et le produit du gène At5g48930 d'Arabidopsis. Les deux séquences présentent 79 % d'identité et 87 % de similarité. (*) représente les acides aminés identiques entre les deux séquences et (:) et (.) le degré de similarité entre les acides aminés. Les motifs « HxxxD » et « DFGWG » sont caractéristiques des acyltransférases membres de la superfamille « BAHD ». Les études biochimiques réalisées sur les deux protéines recombinantes démontrent qu'elles possèdent la même activité enzymatique.

benthamiana, la répression de l'expression du gène *HCT* se caractérise par une diminution de la synthèse du CGA au niveau des feuilles. Lors de la RH, cette réduction de la concentration en CGA pourrait conduire à une diminution de la résistance antivirale et à une accumulation accrue de H₂O₂. De telles études nécessiteront de mettre au point un système de répression stable et homogène de l'activité HCT dans la plante ainsi que la mise en place de divers patho-systèmes.

Stratégie d'isolement de nouvelles acyltransférases impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes : approche phylogénétique chez *Arabidopsis*.

L'analyse globale de la superfamille des acyltransférases de type « BAHD » chez la plante modèle *Arabidopsis* a débuté au laboratoire. L'exploitation des banques d'ESTs (Expressed Sequence Tag) constitue également une source importante de données sur le niveau d'expression des gènes et leur régulation. La recherche de tous les gènes codant pour des acyltransférases putatives appartenant à la famille « BAHD » a été réalisée par similarité de séquence de proche en proche. L'ensemble de ces alignements de séquences nous a permis d'identifier, grâce au séquençage complet du génome, 59 gènes codant pour des acyltransférases putatives appartenant à la superfamille « BAHD » (**Fig. B**). Seul un produit de ces gènes, CER2 (gène At4g24510; masse molaire théorique 47 kDa), a une fonction connue. Le mutant *cer2* et le mutant de maïs *glossy2* sont tous deux affectés dans la biosynthèse de la cire épicuticulaire (Xia *et al.*, 1996 ; Tacke *et al.*, 1995). Ces deux mutants semblent être défectueux dans l'élongation des chaînes d'acides gras, C28 pour *cer2*, et C30 pour *glossy2*. L'homologie des deux gènes mutés avec la famille « BAHD » suggère que le produit de ces deux gènes catalyse une réaction d'élongation des acides gras de manière acyl-CoA dépendante.

Dans l'objectif d'analyser des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans l'expression du gène *HCT* homologue à celui de tabac, nous avons réalisé une analyse phylogénétique de l'ensemble des 59 acyltransférases d'*Arabidopsis* putatives y incluant l'enzyme de tabac (**Fig. B**). Parmi ces 59 protéines, l'une d'entre elles présente 79% d'identité avec l'acyltransférase de tabac (article 1) (**Fig. C**). De plus, ce gène d'*Arabidopsis* (At5g48930) semble être fortement exprimé puisque 40 séquences EST ont été recensées et répertoriées dans les banques de données (http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/thal/search_gene?code=At5g48930). Nous avons donc voulu savoir si cette forte similarité de séquence entre les gènes *HCT* de tabac et At5g48930 d'*Arabidopsis* conduisait à une conservation de l'activité enzymatique. Pour cela nous avons cloné l'ADNc « At5g48930 » puis réalisé des études biochimiques sur le produit du gène. Les résultats obtenus nous ont confirmés que cette protéine présentait la même activité acyltransférase et la même spécificité de substrat que l'*HCT* de tabac. La protéine codée par le gène At5g48930 constitue donc un candidat sérieux pour être

l'acyltransférase fournissant les substrats de la C3H, caractérisée chez *Arabidopsis* (Franke *et al.*, 2002 a, b).

Cette approche de génomique fonctionnelle couplée à des études biochimiques, le tout basé sur une logique « forte similarité de séquence / activité enzymatique proche », semble intéressante et prometteuse en vue d'élucider la fonction biologique de chacune des protéines codées par ces 59 gènes. Nous avons donc procédé à une étude systématique plus globale de cette famille de 59 gènes d'*Arabidopsis* en les confrontant à l'ensemble des acyltransférases de plantes appartenant à la famille « BAHD » et dont la fonction biochimique a été caractérisée chez d'autres espèces végétales. La comparaison de ces séquences nous a permis de classer les protéines d'*Arabidopsis* en plusieurs « groupes fonctionnels », selon le degré de similarité qu'elles présentaient avec les enzymes caractérisées biochimiquement. La **Fig. B** présente l'arbre phylogénétique des 59 protéines d'*Arabidopsis* et des 15 acyltransférases caractérisées chez d'autres espèces végétales dont l'HCT de tabac. La nomenclature des classes fonctionnelles est identique à celle utilisée dans l'article 1. Quatre groupes majeurs ressortent de cette étude:

- A : ce groupe contient les acyltransférases impliquées dans la biosynthèse du taxol; les 13 séquences du groupe présentent au minimum 25% d'identité.
- B : c'est le groupe des acyltransférases impliquées dans la biosynthèse des anthocyanes; les 14 séquences du groupe présentent au minimum 29% d'identité.
- C : dans ce groupe on trouve les acyltransférases impliquées uniquement dans le transfert de groupement acétyle sur des fonctions hydroxyles de métabolites variés; les 16 séquences du groupe présentent au minimum 17% d'identité.
- D : et enfin ce groupe rassemble les acyltransférases, dont l'HCT de tabac, impliquées dans le transfert de groupements hydroxycinnamoyls sur des accepteurs issus de la voie du shikimate (shikimate, quinate, anthranilate); les 5 séquences du groupe présentent au minimum 38% d'identité.

Bien que cette étude préliminaire par similarité de séquence permette d'orienter les recherches, l'activité enzymatique et la fonction biologique de chacune de ces protéines restent à déterminer. Ce type d'approche phylogénétique a déjà été entrepris avec succès sur les protéines de la superfamille des glucosyltransférases dans le laboratoire de D. Bowles. Près de 90 protéines ont été exprimées chez *E. coli* puis leur activité enzymatique testée *in vitro* vis-à-vis de plusieurs substrats appartenant notamment au métabolisme des phénylpropanoïdes. Cette approche a notamment permis de caractériser des glucosyltransférases impliquées dans le métabolisme des monolignols (Lim *et al.*, 2001). En plus des études biochimiques, la détermination du rôle biologique d'un gène peut être menée par d'autres approches telles que la génétique inverse en étudiant des mutants d'*Arabidopsis*, la protéomique ou encore l'analyse du métabolome. En effet, la comparaison par CLHP des

pools métaboliques de la voie des phénylpropanoïdes entre un écotype sauvage et des mutants devrait nous permettre de mieux connaître la fonction biologique des produits des gènes, puisque nous savons que le nombre de gènes (environ 25 000 chez *Arabidopsis*) est bien inférieur à celui des métabolites chez les plantes.

Parallèlement à ces études, il serait intéressant d'analyser le profil d'expression du gène *HCT* en particulier, et des autres acyltransférases putatives en général, et ceci à la fois au cours du développement normal d'*Arabidopsis*, mais également après différents stress biotiques et abiotiques. Dans un premier temps, l'étude de l'expression du gène *HCT* va être réalisée sur la plante modèle *N. tabacum* par PCR quantitative. Des gènes codant pour des protéines soit impliquées dans la lignification (PAL, C4H, OMTs, CCR), soit exprimées lors des réactions de défense vis-à-vis du VMT (protéines PR, COMT II) serviront de gènes de référence. Chez *Arabidopsis*, l'analyse plus globale de l'expression de l'ensemble des acyltransférases de type « BAHD » pourrait être réalisée grâce à la technique des « cDNA microarrays ». Cette étude devrait permettre d'isoler des gènes au profil d'expression intéressant, pour produire par la suite les enzymes recombinantes correspondantes dans *E. coli* et étudier leur spécificité de substrat, deux techniques maîtrisées au laboratoire.

Pour revenir sur la voie de biosynthèse du CGA, l'approche phylogénétique réalisée sur *Arabidopsis* constitue une base intéressante en vue de déterminer le ou les gènes éventuels impliqués dans la synthèse spécifique du CGA. En effet, les deux protéines d'*Arabidopsis* présentant une identité de séquence de l'ordre de 40% avec l'*HCT* de tabac (**Fig.B**; groupe D) constituent des candidats intéressants. Le clonage de ces deux protéines dans un vecteur d'expression a déjà été réalisé au laboratoire par Sébastien Besseau. L'étude biochimique de ces protéines, en comparaison avec l'activité enzymatique de la protéine codée par le gène At5g48930 (l'orthologue du gène *HCT* de tabac), nous permettra d'en savoir plus sur leur rôle biologique.

Approches bioinformatiques :

Avec les programmes de séquençage systématique des génomes, la nécessité de caractériser la fonction des produits de ces gènes est croissante. La biologie structurale constitue un outil important dans la caractérisation des protéines au niveau atomique. Ces études structurales permettent une meilleure compréhension de la fonction biologique des protéines en déterminant les interactions avec leurs substrats et en élucidant les mécanismes réactionnels mis en jeu. En association avec des données biochimiques et physiologiques, elles peuvent conduire à une meilleure compréhension des voies biosynthétiques complexes.

Le métabolisme des phénylpropanoïdes, qui conduit en particulier aux unités monomériques de la lignine, est sujet à des mécanismes de régulation complexes et variés tout

au long de la croissance de la plante et en réponse à divers stimuli environnementaux (paragraphe 1.5.). Les facteurs de transcription (comme les facteurs MYB) (Tamagnone *et al.*, 1998a), les modifications post-traductionnelles ou encore des mécanismes de rétrocontrôle (Pinçon, 1999) sont quelques-uns des éléments principaux connus pour réguler ce métabolisme. Un autre niveau de régulation pourrait dépendre de l'association de certaines enzymes en complexes multienzymatiques (Campbell et Sederoff, 1996), ce qui provoquerait une orientation précise du flux métabolique vers des voies spécifiques, telles que la synthèse de la lignine ou des anthocyanes.

La complexité de la distribution des phénylpropanoïdes dans la plante et en particulier de la lignine (Boudet *et al.*, 1995; Campbell et Sederoff, 1996; Baucher *et al.*, 1998; Whetten *et al.*, 1998; Anterola *et al.*, 2002) pourrait également s'expliquer par l'existence de plusieurs isoformes pour de nombreuses enzymes intervenant dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Au vu de la panoplie des composés phénylpropanes méthoxylés et de la diversité de leurs fonctions dans la physiologie de la plante, les *O*-méthyltransférases (OMTs) du métabolisme des phénylpropanoïdes constituent un modèle intéressant pour des études de type « structure/fonction ».

La CCoAOMT de tabac

Deux sous-familles multigéniques, les COMTs et les CCoAOMTs, catalysent la même réaction chimique de méthylation mais se distinguent par leur profil d'expression au cours du développement de la plante ou en réponse aux agents pathogènes mais surtout par leur spécificité de substrat. Alors que les COMTs acceptent comme substrats aussi bien les acides caféique et 5-hydroxyfêrulique, les esters de CoA correspondants ainsi que les formes aldéhydes et alcools, les CCoAOMTs méthylent spécifiquement les esters de CoA avec une affinité particulière pour le caféoyl-CoA (Maury *et al.*, 1999). Cette différence s'explique par le degré de divergence des séquences codantes qui fait de ces enzymes deux familles distinctes d'OMTs (Ibrahim *et al.*, 1998; Joshi et Chiang, 1998). L'étude de la spécificité de substrat de la CCoAOMT de tabac vis-à-vis des esters de CoA en est un exemple (article 3). La modélisation de la CCoAOMT à l'aide de la structure tridimensionnelle de la catéchol OMT de rat (Vidgren *et al.*, 1994), nous a permis d'identifier des acides aminés indispensables à l'activité enzymatique et responsables de la reconnaissance de la chaîne latérale de CoA. Ces résidus Arg220, Asp58 et Gln61 appartiennent au site actif de l'enzyme, au même titre que ceux intervenant dans la reconnaissance des cofacteurs, mais ils sont responsables de la spécificité de l'enzyme pour les esters de CoA (**Fig. II 11B**). Ceci n'est pas le cas pour la COMT I qui probablement ne reconnaît que la partie phénolique de la molécule, ce qui expliquerait qu'elle soit capable de méthyler aussi bien l'acide 5-hydroxyfêrulique que son ester de CoA ou l'alcool 5-hydroxyconiferylique. Cette approche ne nous a cependant pas

permis de modifier la spécificité de substrat de la CCoAOMT en méthylant par exemple l'acide caféique. Ce modèle d'interaction entre la CCoAOMT et son substrat, le caféoyl-CoA, représente un nouveau modèle de fixation d'une chaîne latérale de CoA (Engel et Wierenga, 1996).

De telles approches structurales couplées à des études biochimiques sont complémentaires aux données obtenues par génie génétique. Elles permettent d'évaluer plus précisément le rôle et l'importance d'enzymes impliquées dans les voies métaboliques. L'étude de l'implication de la CCoAOMT et de la COMT dans la lignification et les réactions de défense aux agents pathogènes chez *N. tabacum* en est un bon exemple.

La COMT I de tabac

Ces dernières années, la première classe d'OMTs de plantes dépendantes de la SAM regroupant la COMT, l'(iso)eugenol OMT (IEMT), la chalcone OMT (ChOMT), l'isoflavone OMT (IOMT) ou encore la flavonol OMT (FOMT) (**Fig. II 1**) a fait l'objet de nombreuses études biochimiques et structurales dont voici quelques exemples.

Après avoir déterminé la première structure d'une chalcone synthase et la base moléculaire de la biosynthèse des polyketides (Ferrer *et al.*, 1999), le groupe de J.P. Noel a caractérisé pour la première fois, en 2001, la structure tridimensionnelle de deux *O*-méthyltransférases impliquées dans le métabolisme des phénylpropanoïdes (Zubieta *et al.*, 2001). Il s'agit de la chalcone OMT (ChOMT) et de l'isoflavone OMT (IOMT), deux *O*-méthyltransférases dépendantes de la SAM et actives sous forme d'homodimère. Cette étude a permis de caractériser de nouveaux domaines caractéristiques des *O*-méthyltransférases de plantes. Certains d'entre eux interviennent dans la dimérisation des protéines et les modèles indiquent, de façon intéressante, que l'interface entre les deux sous-unités participe à la formation du site actif.

Ces nouvelles données ont été la base de nouvelles études de type « structure/fonction ». Les données cristallographiques de l'IOMT ont permis de modéliser deux *O*-méthyltransférases intervenant dans la biosynthèse de phénylpropènes chez le basilic (Gang *et al.*, 2002b). Ces modèles suggéraient que la modification d'un seul acide aminé entre les deux protéines était à l'origine de la différence de spécificité de substrat des deux enzymes. Cette prédiction a été confirmée par mutagenèse dirigée démontrant l'intérêt de telles connaissances structurales pour mieux comprendre l'évolution des spécificités enzymatiques.

Parmi toutes les séquences d'*Arabidopsis* prédites comme appartenant à la famille des *O*-méthyltransférases de plante, on peut présumer la fonction d'un petit nombre car elles sont phylogénétiquement proches d'une OMT caractérisée. La capacité de prédire la spécificité de substrat d'un produit de gène sur la seule base de sa séquence primaire et par conséquent la possibilité de connaître la fonction biologique de l'enzyme représente un challenge

intéressant. Schröder et Coll. (2002) ont tenté de prédire les substrats d'OMTs clonés chez *Catharanthus roseus* en utilisant l'ensemble des données connues sur les *O*-méthyltransférases dépendantes de la SAM et notamment les nouveaux motifs identifiés par Zubieta et Coll. (2001). En confrontant leur prédiction à des études biochimiques, les auteurs ont démontré que les données structurales constituaient des éléments importants dans l'étude biologique de nouvelles enzymes.

Comme nous l'avons déjà vu dans l'introduction, la COMT I est une des enzymes clef impliquée dans la biosynthèse de la lignine d'Angiospermes. Les études biochimiques ont montré qu'*in vitro*, cette *O*-méthyltransférase dépendante de la SAM est active aussi bien vis-à-vis des acides caféique et 5-OH-férulique que des esters de CoA, aldéhydes ou alcools correspondants. La structure cristallographique de la COMT I sous forme d'homodimère et en complexe avec la S-adénosyl-L-homocystéine (SAH) et l'acide férulique a récemment été obtenue (Zubieta *et al.*, 2002). Cette étude a conduit à une compréhension structurale de la spécificité de substrat en identifiant, parallèlement à des études de mutagenèse, des résidus impliqués dans la reconnaissance des substrats. Il a également été montré que contrairement à d'autres *O*-méthyltransférases caractérisées (Zubieta *et al.*, 2001), les positions du noyau aromatique et de la SAM au niveau du site actif sont particulièrement éloignées. Cette architecture plus « espacée » pourrait expliquer la faible spécificité de substrat de la COMT I vis-à-vis des différents substrats phénoliques cités précédemment. L'identification de résidus modifiant l'affinité de l'enzyme pour des substrats physiologiques constitue un point de départ intéressant en vue de manipuler la composition monomérique de la lignine au sein de plantes transgéniques (Zubieta *et al.*, 2002).

Comme nous venons de le voir, l'activité catalytique de la majorité des OMTs de plantes est dépendante de la formation d'homodimères. Frick et Coll. (1999, 2001) ont cloné chez *Thalictrum tuberosum* 4 ADNc très similaires entre eux (de 93 à 99%) et codant pour des *O*-méthyltransférases possédant 71% de similarité avec d'autres *O*-méthyltransférases de plantes. La caractérisation biochimique de ces enzymes a permis de montrer qu'elles étaient actives sous forme dimérique. Sous forme d'homodimère, les 4 enzymes présentent des activités communes (vis-à-vis de l'acide caféique) mais également spécifiques (vis-à-vis d'alcaloïdes de type norcolaurine). Mais, *in vitro*, l'obtention d'hétérodimères a permis d'obtenir des activités de méthylation vis-à-vis de nouveaux substrats. Cette étude ajoute un niveau de complexité à l'image que l'on peut se faire de la fonction, *in planta*, de ces différentes enzymes et de leurs isoformes.

En plus de ces études « structure/fonction », les banques de données sont constamment approvisionnées en nouvelles séquences codant pour des OMTs de plantes (Lavid *et al.*, 2002; Frick *et al.*, 2001) constituant une source importante de renseignements.

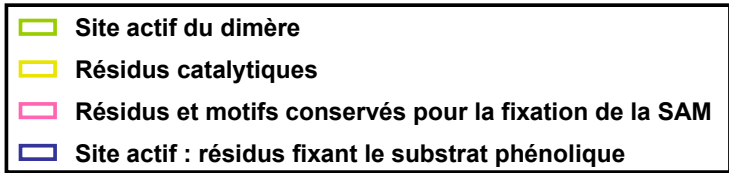
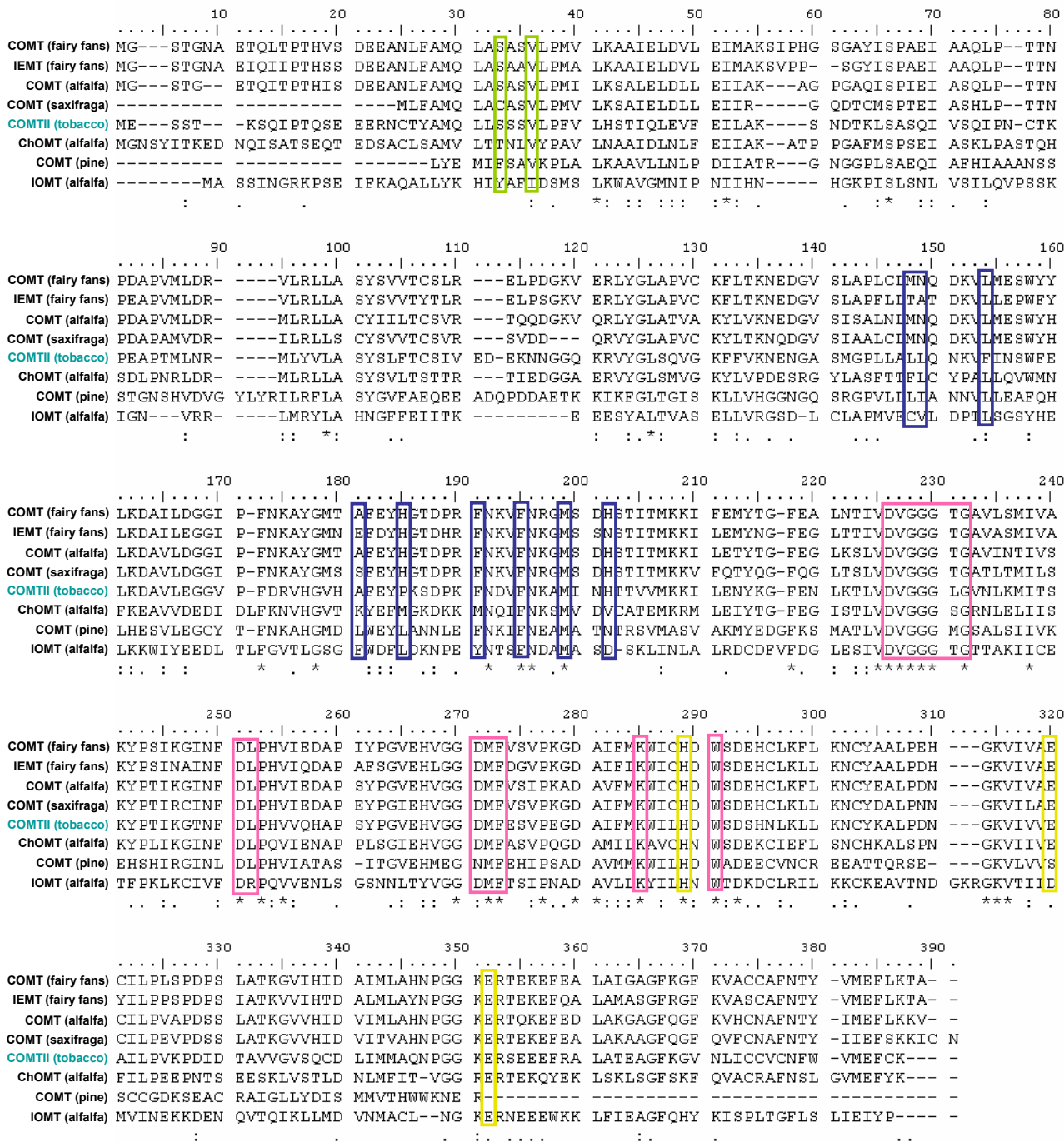


Figure D. Alignement de séquences de 4 COMTs et de 3 OMTs de plantes; cet alignement intègre également la séquence de la COMT II de tabac. Les résidus et les motifs conservés présentés sur cette figure regroupent l'ensemble des connaissances actuelles (Zubieta *et al.*, 2002).

Modélisation de la COMT II, une classe d'OMTs à part chez le tabac

Contrairement à la classe I des COMTs, exprimée constitutivement dans les tissus lignifiés, la COMT II de tabac présente une expression faible dans les tissus sains et une stimulation importante lors d'une infection par le VMT (Pellegrini *et al.*, 1993; Toquin *et al.*, 2003). Des tabacs inhibés pour l'expression de la COMT II ne présentent pas de modification dans leur développement et montrent une faible diminution de la résistance au VMT (résultats non publiés). L'expression du promoteur COMT II au niveau des racines (Toquin *et al.*, 2003) pourrait indiquer un rôle de cette enzyme dans la subérisation des tissus souterrains, d'autant que l'analyse des plantes réprimées pour la COMT II indique une diminution de la quantité de la subérine déposée au niveau des racines.

La présence de deux classes, l'une reliée à la lignification (COMT I), l'autre aux réactions de défense (COMT II) n'a été décrite jusqu'ici que dans le tabac. De plus, les deux classes d'*O*-méthyltransférases présentent des spécificités de substrat différentes (Maury *et al.*, 1999). Alors que la COMT I méthyle efficacement l'acide caféique, l'acide 5-hydroxyfêrulique et les esters de CoA correspondants, ces derniers sont de très mauvais substrats pour la COMT II. Par contre, le catéchol est un très bon substrat pour la COMT II. Cette divergence de spécificité de substrat entre les deux classes d'enzymes pourrait s'expliquer par des différences au niveau de leur séquence primaire. En effet, les comparaisons de séquences peptidiques entre les deux classes de COMTs de tabac montrent qu'elles partagent environ 53% d'identité (Pellegrini *et al.*, 1993). Ces résultats contrastent avec la conservation de séquence habituelle entre COMTs d'Angiospermes dont l'identité est supérieure à 75%. Ces résultats confirment donc que la COMT II constitue une classe d'*O*-méthyltransférase particulière chez le tabac.

La cristallisation récente de l'*O*-méthyltransférase de classe I de luzerne (Zubieta *et al.*, 2002), qui présente 79% d'identité avec la COMT I de tabac et 54% d'identité avec la COMT II constitue un modèle d'étude intéressant pour essayer de comprendre la base structurale de la spécificité de substrat de la COMT II. L'alignement de séquence présentée **Fig. D** compare la séquence primaire de la COMT II de tabac avec celles de 4 COMTs et de 3 autres OMTs étudiées au préalable par Zubieta et Coll. (2001, 2002). On constate que les acides aminés intervenant dans la reconnaissance de la SAM, ceux essentiels à la formation du dimère et ceux du site catalytique, sont strictement conservés dans la séquence de la COMT II. Par contre, la nature des résidus identifiés comme intervenant dans la fixation et la reconnaissance spécifique du substrat phénolique est très variable d'une séquence à l'autre. Au sein de la COMT II, on observe notamment une substitution de la leucine 154 en phénylalanine et de l'histidine 185 en proline par rapport à la COMT I de luzerne. Contrairement à la CCoAOMT de tabac que nous avons modélisée (article 3), l'activité de méthylation des COMTs est indépendante des cations divalents, tels que le Mg^{2+} et jusqu'à présent toutes les OMTs

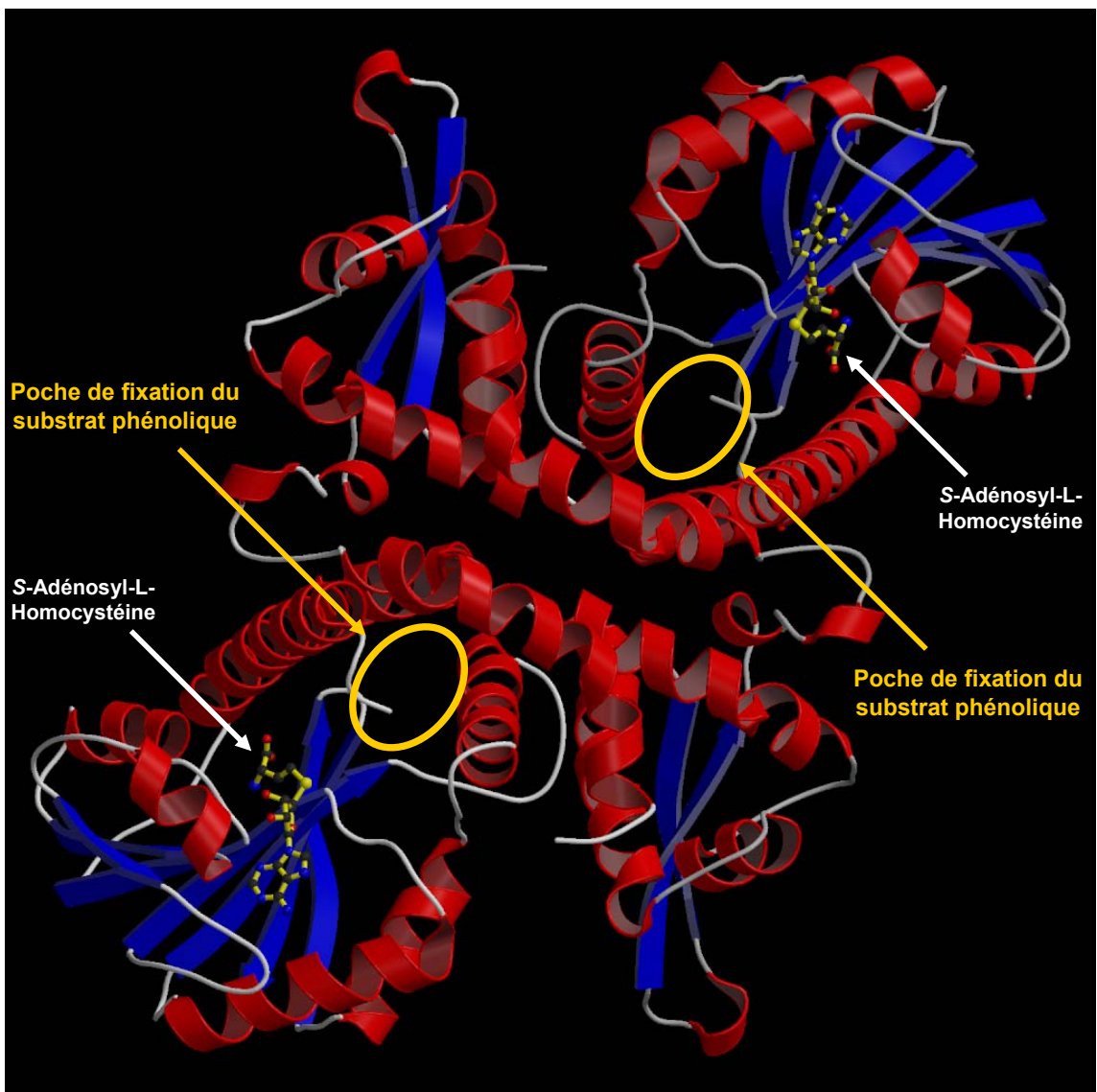


Figure E. Modèle tridimensionnel de l'homodimère de la COMT II de tabac. Chaque monomère présente une poche de fixation de la SAM et une poche de fixation du substrat phénolique (cercle jaune). Dans ce modèle, seul la SAH est représentée car la cristallisation de la COMT de luzerne a été réalisée en sa présence.

La modélisation a été effectuée à partir des données cristallographiques de la COMT (de classe I) de luzerne (Zubieta *et al.*, 2002; numéro d'accèsion PDB : 1KYW). Les hélices- α , les feuillets- β et les boucles sont respectivement représentés par des hélices rouges, des flèches bleues et des filaments gris. La SAH est constituée du squelette carboné jaune. Les atomes de carbone sont en noir, les atomes d'oxygène en rouge, les atomes d'azote en bleu et l'atome de soufre de la SAH en jaune. Représentation réalisée par Marc Bergdoll.

appartenant à cette classe sont actives sous forme homodimérique (Zubieta *et al.*, 2001, 2002). Toutes ces données nous ont permis de réaliser un premier modèle tridimensionnel de la COMT II sous forme d'homodimère (**Fig. E**). Compte tenu du score des alignements présentés **Fig. D** et de la conservation des résidus essentiels, le modèle est fiable. Des analyses biochimiques complémentaires sur la spécificité de substrat de la COMT II ainsi qu'une étude approfondie des séquences consensus nous permettront d'identifier les résidus et/ou les motifs conférant la spécificité de substrat particulière de la COMT II, et de déterminer la fonction biologique de cette protéine dont le profil d'expression est comparable à celui des protéines de défense PR (Pathogenesis Related).

Etudes structurales de l'enzyme HCT

A l'heure actuelle, dans le règne animal et végétal, il a été caractérisé deux mécanismes catalytiques distincts pour transférer le groupement acyle d'un ester de CoA sur une molécule acceptrice. Le premier mécanisme fait intervenir un « double-transfert », c'est-à-dire que le groupement acyle de l'ester de CoA est d'abord transféré sur l'enzyme (résidu cystéine) avant d'être transféré sur la molécule acceptrice finale (Thompson *et al.*, 1989); c'est le cas par exemple des thiolases intervenant dans la β -oxydation des acides gras. Le second mécanisme fait intervenir la formation d'un complexe ternaire entre l'enzyme, l'ester de CoA et l'accepteur juste avant le transfert direct du groupement acyle de l'ester de CoA sur le substrat accepteur, sans la formation de liaison covalente entre l'acyle et l'enzyme. Ce mécanisme, utilisé par la chloramphénicol *O*-acétyltransférase (CAT) (Shaw et Leslie, 1991) et l'histone acétyltransférase (HAT) (Tanner *et al.*, 1999), a fait l'objet d'études basées sur les structures tridimensionnelles. Ces données ont permis d'identifier les résidus du site actif. Les mécanismes catalytiques de ces deux acyltransférases présentent des caractéristiques communes : dans le complexe ternaire, une base active le groupement nucléophile de la molécule acceptrice par déprotonation, permettant ensuite l'attaque nucléophile sur le carbone du carbonyle de l'acyl-CoA (exemple **Fig. F**, au verso). Chez la CAT, il a été démontré que l'histidine 195 du motif « HxxxD » peut jouer le rôle de base pendant la catalyse.

La superfamille des acyltransférases dépendantes des esters de CoA « BAHD », à laquelle appartient HCT, est distincte aussi bien au niveau fonctionnel qu'au niveau phylogénétique de ces deux classes d'acyltransférases, et a fait l'objet de très peu d'études structurales (St-Pierre et De Luca, 2000). Le mécanisme catalytique de ces enzymes est par conséquent très mal connu, même si quelques données biochimiques telles que l'inactivation des enzymes par le diéthyl pyrocarbonate indiquent l'importance de résidus histidine dans l'activité catalytique. La présence du motif « HxxxD » à la fois chez la CAT et les acyltransférases « BAHD », ainsi que des études de comparaison de séquences laissent penser

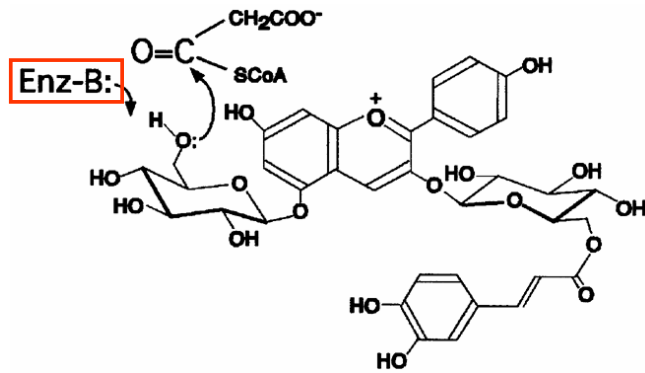


Figure F. Proposition du mécanisme catalytique d'une acyltransférase de la famille « BAHD » transférant un groupement malonyl sur une pélargonidine (Suzuki *et al.*, 2003). Le résidu His167 (ou Asp390) jouerait le rôle de base (Enz-B), conduisant à une déprotonation d'un groupement hydroxyle, permettant l'attaque nucléophile de la molécule acceptrice (anthocyanine) sur le carbone carbonyle du malonyl-CoA.

que les enzymes « BAHD » peuvent être proches de la CAT au niveau mécanistique (St-Pierre et De Luca, 2000).

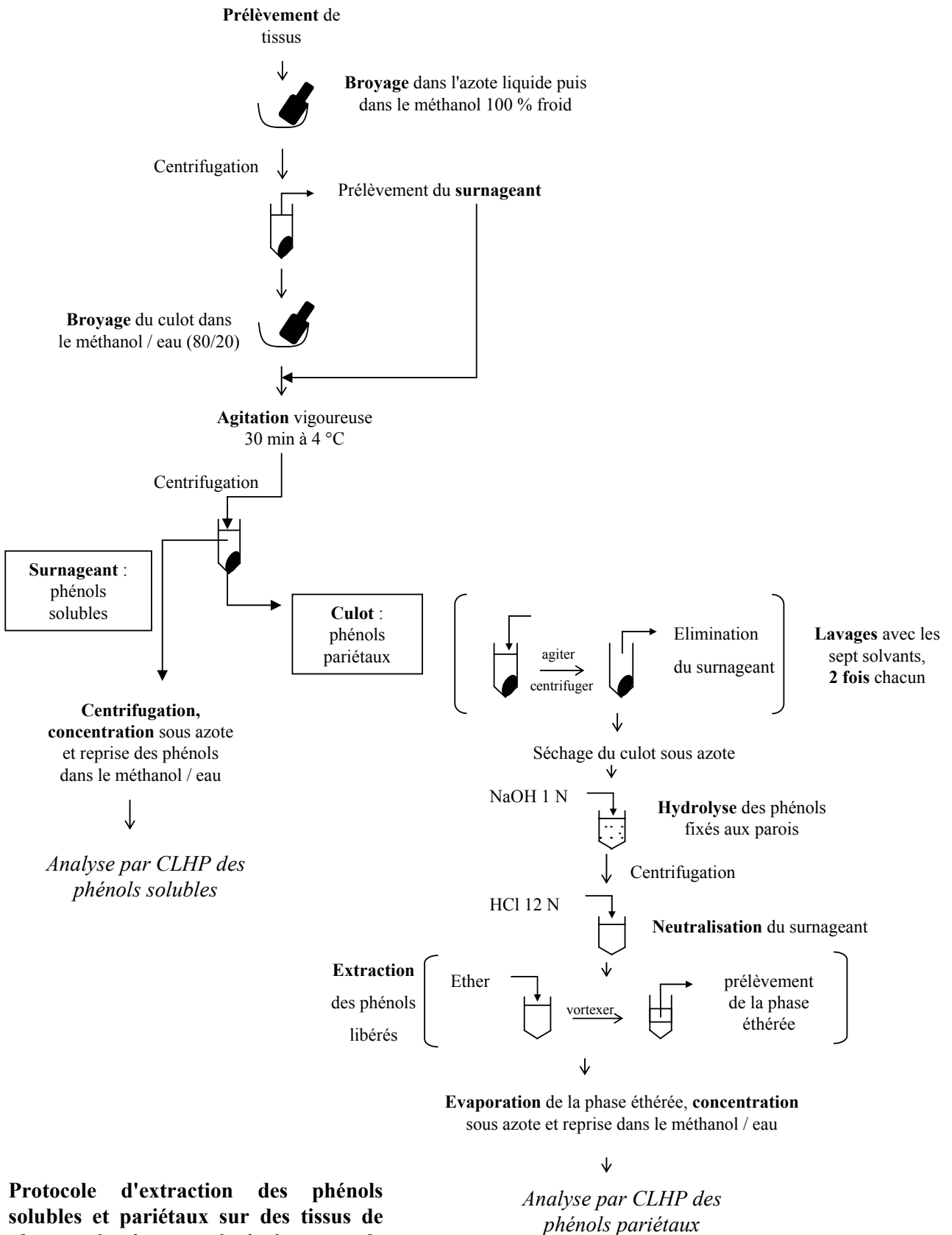
Très récemment, des études fonctionnelles ont été réalisées sur une acyltransférase « BAHD » impliquée dans l'acylation d'anthocyanine chez *Salvia splendens* (Suzuki *et al.*, 2003). Ces auteurs, par une approche de mutagenèse dirigée et d'alignement de séquences, ont identifié des acides aminés fonctionnels impliqués dans l'activité enzymatique. Ils ont notamment caractérisé deux acides aminés susceptibles de jouer le rôle de base dans le complexe ternaire [malonyl-CoA / anthocyanine / enzyme] : l'histidine 167 et l'acide aspartique 390, présents respectivement dans les motifs « HxxxD » et « DFGWG » (**Fig. F**).

En conclusion, ce travail a permis de caractériser une nouvelle enzyme du métabolisme des phénylpropanoïdes à activité acyltransférase (HCT) et de démontrer l'importance de cette enzyme dans la biosynthèse de la lignine. L'élucidation de sa fonction dans d'autres processus physiologiques, tels que le métabolisme de l'acide chlorogénique et les réactions de défense, devra être basée sur des approches combinant la génomique, l'enzymologie, les analyses biochimiques de métabolites, et la biologie cellulaire et structurale.

MATERIEL ET METHODES

(en complément des articles)

1. Matériel végétal et inoculation du virus 140
2. Extraction et analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) des phénols solubles et pariétaux de *Nicotiana benthamiana* 140
3. Analyses histologiques au bleu de toluidine 142



Protocole d'extraction des phénols solubles et pariétaux sur des tissus de plantes témoins ou réprimées pour le gène *HCT*.

Matériel et méthodes

Le matériel et les méthodes présentés dans cette partie concernent uniquement les résultats complémentaires du premier chapitre. Le reste des techniques et l'ensemble des informations nécessaires à la compréhension des expériences sont détaillés dans chacun des articles 1, 2 et 3.

1. Matériel végétal et inoculation du virus

Les plantes (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) sont conditionnées dans une logette climatisée à $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sous une luminosité de 5000 lux et une photopériode jour/nuit de 16h/8h. L'inoculation du virus de la mosaïque du tabac (VMT) se fait par inoculation mécanique. Cette méthode consiste à frotter, à l'aide d'un coton, la surface des feuilles avec une suspension de particules virales purifiées (VMT, souche commune U1 de 0,1 à 1 $\mu\text{g/ml}$) en présence d'un abrasif, la célite (10 mg/ml). Les blessures générées constituent autant de sites d'infection potentiels. Après quelques minutes de contact, les feuilles sont rincées à l'eau pour enlever l'excès de célite et de particules virales.

Les prélèvements, en vue de mesurer l'activité HCT, ont été réalisés à l'aide d'un emporte-pièce (diamètre de 8mm). Les conditions d'incubation et les techniques d'analyses des produits de réaction sont celles présentées dans l'article 2. Le milieu réactionnel est mis en présence de $6\mu\text{g}$ de protéines totales puis incubé 15 min à 30°C .

2. Extraction et analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) des phénols solubles et pariétaux de *Nicotiana benthamiana*

Les phénols solubles et pariétaux sont extraits de tige (entre-noeud n°5) ou de feuilles de *N. benthamiana* réprimées pour l'expression du gène *HCT*. Des plantes infiltrées avec la construction TRV-GFP sont utilisées comme témoin. Les phénols extraits sont séparés par CLHP. Ils sont détectés par spectrophotométrie et fluorimétrie (Waters, USA), puis identifiés sur la base de leur temps de rétention et de leur spectre d'absorption, en comparaison avec des standards.

2.1. Protocole d'extraction des phénols (Tamagnone *et al.*, 1998a; Keller *et al.*, 1996)

Les étapes sont résumées sur la figure ci-contre. Les tissus sont finement broyés dans l'azote liquide. Le broyage est poursuivi dans le méthanol 100 % froid (500 μL pour 100 mg de poids frais) puis centrifugé 5 min à 20000 g à 4°C . Puis on réalise un second broyage sur le

culot dans le méthanol / eau, 2:1, (200 µL de cette solution pour 100 mg de poids frais). Le surnageant de la première centrifugation et ce deuxième broyat sont rassemblés et agités vigoureusement pendant 30 min à 4°C pour favoriser l'extraction des phénols. Le mélange est ensuite centrifugé 5 min à 20000 g à 4°C. Le culot est composé essentiellement de parois cellulaires; il est conservé à - 20 °C en vue de l'analyse des phénols pariétaux.

Le surnageant contenant les phénols solubles est clarifié par centrifugation 30 min à 600 g à 4°C. Le surnageant est concentré au maximum sous azote puis repris dans le méthanol / eau, 2:1, à raison de 150 µl pour 100 mg de poids frais. L'échantillon contenant les phénols solubles est prêt à être injecté et analysé par CLHP.

Le culot contenant les parois cellulaires est lavé deux fois successivement avec chacun de ces sept solvants : méthanol 50 %, eau, SDS 0,5 %, NaCl 1 M, méthanol 100 %, acétone puis éther. Ces lavages ont pour but d'optimiser l'hydrolyse basique en éliminant toutes les molécules adsorbées sur la paroi. Pour chaque lavage le tube est placé sous agitation vigoureuse 15 min à 4 °C, puis centrifugé 5 min à 1700 g afin de culoter les débris cellulaires. Au dernier lavage, le surnageant est éliminé et le culot séché sous azote. L'hydrolyse des phénols pariétaux est réalisée toute la nuit à 70°C sous agitation douce en présence de NaOH 1 N. Le tube est ensuite centrifugé 15 min à 1700 g, puis le surnageant est neutralisé par ajout d'HCl 12 N. L'extraction est réalisée trois fois à l'éther, puis la solution étherée est concentrée sous azote et reprise dans le méthanol / eau, 2:1, à raison de 150 µL pour 100 mg de poids frais. L'échantillon contenant les phénols pariétaux est prêt à être analysé dans les mêmes conditions que les phénols solubles.

2.2. Analyse par CLHP des phénols extraits

Les échantillons sont analysés par CLHP en phase reverse sur une colonne C18 (Novapak, 4 µm, 4,6 x 250 mm, Waters, USA). Ils sont élués avec un débit de 1 ml / min pendant 70 min par un gradient progressif en acétonitrile. Les premières molécules éluées sont les plus hydrophiles. Les solvants utilisés sont les suivants :

A : 10 % acétonitrile ; 90 % eau ; 0,1 % acide formique (v/v).

B : 80 % acétonitrile ; 20 % eau ; 0,1 % acide formique (v/v).

Après la charge, on procède pendant 50 min à une élution lente par un gradient linéaire allant de 100 % A à 50 % B. De 50 à 55 min, on passe à 100 % B. Le cycle d'élution est achevé en revenant en 5 min à 100 % A. La colonne est alors rééquilibrée dans le solvant A pendant 10 min. Les quantités d'esters hydroxycinnamoyl-shikimique et hydroxycinnamoyl-quinique ont été déterminées par leur absorption à 320 nm, en utilisant des standards. Les 3-*O*- et 4-*O*-caféoylquiniques sont produits en chauffant de l'acide chlorogénique (5-*O*-

caféoylquinique, Fluka, Suisse) à 90°C pendant 30 min dans un tampon phosphate (0,2M; pH 7,0) (Strack et Gross, 1990). Les isomères sont séparés par CLHP et collectés.

3. Analyses histologiques au bleu de toluidine

Des fragments de tige de plants de *N. benthamiana*, âgés de 8 semaines, et infectés depuis 4 semaines par les constructions TRV-GFP ou TRV-HCT, sont fixés pendant une nuit dans une solution contenant 3,7% de formaldéhyde, 50% d'éthanol et 5% d'acide acétique après infiltration sous vide du fixateur. Ils sont ensuite déshydratés dans des bains successifs d'éthanol, puis d'Histoclear et inclus dans le paraplaste (paraplast +; Oxford) en vue de réaliser des coupes transversales de 10 µm. Les coupes sont montées sur des lames en verre, réhydratées et colorées au bleu de toluidine 1% dilué au 1/30 pendant 4 minutes. Les lames sont ensuite lavées dans l'eau, puis déshydratées dans des bains d'éthanol et montées à l'aide d'Eukitt. Les observations sont réalisées à loupe binoculaire et au microscope.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Cette partie indexe l'ensemble des références citées dans le manuscrit (articles 1, 2 et 3 compris).

A

Abbott, J. C., Barakate, A., Pinçon, G., Legrand, M., Lapierre, C., Mila, I., Schuch, W. & Halpin, C. (2002). Simultaneous suppression of multiple genes by single transgenes. Down-regulation of three unrelated lignin biosynthetic genes in tobacco. *Plant Physiol.* **128**, 844-853.

Allina, S. M., Pri-Hadash, A., Theilmann, D. A., Ellis, B. E. & Douglas, C. J. (1998). 4-coumarate: Coenzyme A ligase in hybrid poplar. *Plant Physiol.* **116**, 743-754.

Allwood, E. G., Davies, D. R., Gerrish, C. & Bolwell, G. P. (2002). Regulation of CDPKs, including identification of PAL kinase, in biotically stressed cells of French bean. *Plant Mol Biol* **49**, 533-44.

Allwood, E. G., Davies, D. R., Gerrish, C., Ellis, B. E. & Bolwell, G. P. (1999). Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett* **457**, 47-52.

Anterola, A. M., Jeon, J. H., Davin, L. B. & Lewis, N. G. (2002). Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*: factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **277**, 18272-80.

Anterola, A. M. & Lewis, N. G. (2002). Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* **61**, 221-94.

Assicot, M. & Bohuon, C. (1970). Purification and studies of catechol-O-methyltransferase of rat liver. *Eur. J. Biochem.* **12**, 490-495.

Atalla, R. H. & Agarwal, U. P. (1985). Raman microprobe evidence for lignin orientation in the cell walls of native woody tissue. *Science* **227**, 636-638.

Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M. T., Monties, B., Fritig, B. & Legrand, M. (1995). Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *Plant J.* **8**, 465-477.

Axelrod, J. & Tomchick, R. (1958). Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. *J. Biol. Chem.* **233**, 702-705.

Axelrod, J. & Weissbach, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science* **131**, 1312.

B

Bandoniene, D. & Murkovic, M. (2002). On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2482-2487.

Bao, W., O'Malley, D. M., Whetten, R. & Sederoff, R. R. (1993). A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* **260**, 672-674.

Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J. & Elkind, Y. (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7608-7612.

Baucher, M., Bernard-Vailhé, M. A., Chabbert, B., Besle, J. M., Opsomer, C., Van Montagu, M. & Botterman, J. (1999). Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. *Plant Mol. Biol.*, 437-447.

Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M. T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inzé, D., Jouanin, L. & Boerjan, W. (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol.* **112**, 1479-1490.

Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M. & Boerjan, W. (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Crit. Rev. Plant Sci.* **17**, 125-197.

- Bell-Lelong, D. A., Cusumano, J. C., Meyer, K. & Chapple, C. (1997).** Cinnamate-4-hydroxylase expression in Arabidopsis. Regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol.* **113**, 729-738.
- Bender, J. & Fink, G. R. (1998).** A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5655-60.
- Benhamou, N. & Lafontaine, P. J. (1995).** Ultrastructural and cytochemical characterization of elicitor-induced structural responses in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Planta* **197**, 89-102.
- Berman, H., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T., Weissig, H., Shindyalov, I. & Bourne, P. (2000).** The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **28**, 235-242.
- Bernards, M. A., Lopez, M. L., Zajicek, J. & Lewis, N. G. (1995).** Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin. *J. Biol. Chem.* **270**, 7382-7386.
- Bernards, M. A. & Razem, F. A. (2001).** The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall biopolymer. *Phytochemistry* **57**, 1115-22.
- Bernard-Vailhé, M. A., Besle, J. M., Cornu, A. & Maillot, M. P. (1995).** Composition and biological degradability of lignin modified transgenic plants. *Ann. Zootech. Supp.*, 44-68.
- Bertocci, B., Miggiano, V., Da Prada, M., Dembic, Z., Lahm, H. W. & Malherbe, P. (1991).** Human catechol-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1416-1420.
- Bevan, M., Shufflebottom, D., Edwards, K., Jefferson, R. & Schuch, W. (1989).** Tissue- and cell-specificity activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *EMBO J.* **8**, 1899-1906.
- Binns, A., Chen, R. H., Wood, H. N. & Lynn, D. G. (1987).** Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucosides: do cell wall components control cell division? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 980-984.
- Bischoff, M., Schaller, A., Bieri, F., Kessler, F., Amrhein, N. & Schmid, J. (2001).** Molecular characterization of tomato 3-dehydroquinate dehydratase-shikimate:NADP oxidoreductase. *Plant Physiol* **125**, 1891-900.
- Blee, K., Choi, J. W., O'Connell, A. P., Jupe, S. C., Schuch, W., Lewis, N. G. & Bolwell, G. P. (2001).** Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. *Phytochemistry* **57**, 1159-66.
- Blount, J. W., Korth, K. L., Masoud, S. A., Rasmussen, S., Lamb, C. & Dixon, R. A. (2000).** Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol* **122**, 107-16.
- Bolwell, G. P. (1988).** Synthesis of cell wall components : aspects of control. *Phytochemistry* **27**, 1235-1253.
- Bolwell, G. P. (1992).** A role for phosphorylation in the downregulation of phenylalanine ammonia lyase in suspension cultured cells of French bean. *Phytochemistry* **31**, 4081-4086.
- Bonifati, V. & Meco, G. (1999).** New, selective catechol-O-methyltransferase inhibitors as therapeutic agents in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* **81**, 1-36.
- Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A. & Lamb, C. (2000).** Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.
- Boudet, A. (2000).** Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 81-96.
- Boudet, A.-M. (1998).** A new view of lignification. *Trends Plant. Sci.* **3**, 67-71.
- Boudet, A. M., Lapierre, C. & Grima-Pettenati, J. (1995).** Biochemistry and molecular biology of lignification. *New Phytol.* **129**, 203-236.
- Boveris, A., Valdes, L. & Alvarez, S. (2002).** Inhibition by wine polyphenols of peroxynitrite-initiated chemiluminescence and NADH oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 90-102.
- Bowes, B. G. (1996).** *Structure des Plantes*: INRA, Paris, 1998 - Version française.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal. Bioch.* **72**, 248-254.

Brill, E. M., Abrahams, S., Hayes, C. M., Jenkins, C. L. & Watson, J. M. (1999). Molecular characterisation and expression of a wound-inducible cDNA encoding a novel cinnamyl-alcohol dehydrogenase enzyme in lucerne (*Medicago sativa* L.). *Plant Mol Biol* **41**, 279-91.

Brown, S. A. (1981). Coumarins. In *The Biochemistry of Plants: a comprehensive treatise.*, pp. 269-300. Edited by E. E. Conn: Academic Press.

Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2001). *Biochemistry & molecular biology of plants.* Edited by Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.

Bugl, H., Fauman, E., Stacker, B., Zheng, F., Kushner, S., Saper, M., Bardwell, J. & Jakob, U. (2000). RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* **6**, 349-360.

Bugos, R. C., Chiang, V. L. & Campbell, W. H. (1991). cDNA cloning, molecular analysis and seasonal expression of lignin-specific caffeic/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1203-1215.

Burlat, V., Ambert, K., Ruel, K. & Joseleau, J.-P. (1997). Relationship between the nature of lignin and the morphology of degradation performed by white-rot fungi. *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 645-654.

Burlat, V., Kwon, M., Davin, L. B. & Lewis, N. G. (2001). Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry* **57**, 883-97.

Burns, J., Gardner, P., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., McPhail, D., Lister, C., Matthews, D., MacLean, M., Lean, M., Duthie, G. & Crozier, A. (2000). Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity and phenolic content of red wines. *J Agric Food Chem* **48**, 220-230.

Burton, R. A., Gibeaut, D. M., Bacic, A., Findlay, K., Roberts, K., Hamilton, A., Baulcombe, D. C. & Fincher, G. B. (2000). Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell* **12**, 691-705.

Busam, G., Grimmig, B., Kneusel, R. E. & Matern, U. (1997b). Isolation of tobacco cDNAs encoding caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase. *Plant Physiol.* **113**, 1003.

Busam, G., Junghanns, K. J., Kneusel, R. E., Kassemeyer, H.-H. & Matern, U. (1997a). Characterization and expression of caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol.* **115**, 1039-1048.

C

Campbell, M. M. & Sederoff, R. R. (1996). Variation in lignin content and composition. Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol.* **110**, 3-13.

Carpita, N. C. & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**, 1-30.

Cassagne, C., Lessire, R., Bessoule, J. J., Moreau, P., Creach, A., Schneider, F. & Sturbois, B. (1994). Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants. *Prog Lipid Res* **33**, 55-69.

Chabannes, M., Barakate, A., Lapierre, C., Marita, J. M., Ralph, J., Pean, M., Danoun, S., Halpin, C., Grima-Pettenati, J. & Boudet, A. M. (2001b). Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of cinnamoyl CoA reductase (CCR) and cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) in tobacco plants. *Plant J* **28**, 257-70.

Chabannes, M., Ruel, K., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Jauneau, A., Joseleau, J. P. & Boudet, A. M. (2001a). In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels. *Plant J* **28**, 271-82.

Chabbert, B., Monties, B., Liu, Y. T. & Lagrimini, M. (1992). Lignin content and composition in transgenic tobacco plants with altered peroxidase activity. In *In proceedings 5th International conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, pp. 481-485. Edited by M. Kuwahara & e. u. P. C. M. Shimada, Tokyo).

Chabbert, B., Tollier, M. T., Monties, B., Barrière, Y. & Argillier, O. (1994). Biological variability in lignification of maize: expression of the brown midrib bm3 mutation in three maize cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **64**, 349-355.

Chapple, C., Vogt, T., Ellis, B. & Somerville, C. (1992). An Arabidopsis mutant defective in the general phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **4**, 1413-1424.

Chen, C., Meyermans, H., Burggraeve, B., De Rycke, R., Inoue, K., De Vlesschauwer, V., Steenackers, M., Van Montagu, M., Engler, G. & Boerjan, W. (2000). Cell-specific and conditional expression of caffeoyl-Coenzyme A-3-O-methyltransferase in Poplar. *Plant Physiol.* **123**, 853-867.

Chen, F., Kota, P., Blount, J. W. & Dixon, R. A. (2001). Chemical syntheses of caffeoyl and 5-OH coniferyl aldehydes and alcohols and determination of lignin O-methyltransferase activities in dicot and monocot species. *Phytochemistry* **58**, 1035-42.

Chen, F., Yasuda, S. & Fukushima, F. (1999). Evidence for a novel biosynthetic pathway that regulates the ratio of syringyl to guaiacyl residues in lignin in the differentiating xylem of *Magnolia kobus* DC. *Planta* **207**, 597-603.

Cheng, S. H., Sheen, J., Gerrish, C. & Bolwell, G. P. (2001). Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Lett* **503**, 185-8.

Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B. & Saindrenan, P. (2002). Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc:phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell* **14**, 1093-107.

Chong, J., Pierrel, M. A., Atanassova, R., Werck-Reichhart, D., Fritig, B. & Saindrenan, P. (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiol* **125**, 318-28.

Christensen, J. H., Bauw, G., Welinder, K. G., Van Montagu, M. & Boerjan, W. (1998). Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant Physiol.* **118**, 125-135.

Christensen, J. H., Overney, S., Rohde, A., Diaz, W. A., Bauw, G., Simon, P., Van Montagu, M. & Boerjan, W. (2001). The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant Mol Biol* **47**, 581-93.

Christie, P. J., Alfenito, M. R. & Walbot, V. (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* **194**, 541-549.

Clifford, M. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 362-372.

Collazo, P., Montoliu, L., Puigdomenech, P. & Rigau, J. (1992). Structure and expression of the lignin O-methyltransferase gene from *Zea mays* L. *Plant Mol. Biol.* **20**, 857-867.

Collendaveloo, J., Legrand, M. & Fritig, B. (1982). Plant disease and regulation of enzymes involved in lignification. *De novo* synthesis controls O-methyltransferase activity in hypersensitive tobacco leaves infected by tobacco mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* **21**, 271-281.

Collendaveloo, J., Legrand, M., Geoffroy, P., Barthelemy, J. & Fritig, B. (1981). Purification and properties of the three o-diphenol-O-methyltransferases of tobacco leaves. *Phytochemistry* **20**, 611-616.

Coquoz, J. L., Buchala, A. & Metraux, J. P. (1998). The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol.* **117**, 1095-1101.

Côté, W. A. (1977). *Wood ultrastructure in relation to chemical composition.*, Plenum Press, New York edn: Loewus, F. A. and Runeckles, V. C.

Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and molecular biology of plants*, pp. 1250-1318. Edited by B. B. Buchanan, W. Gruissem & R. L. Jones. Rockville: American society of plant physiologists.

D

Dakora, F. D. & Phillips, D. A. (1996). Diverse functions of isoflavonoides in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexines. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**, 1-20.

D'Auria, J. C., Chen, F. & Pichersky, E. (2002). Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol.* **130**, 466-476.

Davin, L. B. & Lewis, N. G. (1991). *Recent advances in phytochemistry*: New York: Plenum press.

- Davin, L. B. & Lewis, N. G. (2000).** Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol* **123**, 453-62.
- Davin, L. B., Wang, H.-B., Crowell, A. L., Bedgar, D. L., Martin, D. M., Sarkanen, S. & Lewis, N. G. (1997).** Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **275**, 362-366.
- Dence, C. (1992).** *The determination of lignin*. Berlin: Springer-Verlag.
- Dharmawardhana, D. P., Ellis, B. E. & Carlson, J. E. (1999).** cDNA cloning and heterologous expression of coniferin β -glucosidase. *Plant Mol. Biol.* **40**, 365-372.
- Dixon, R. A. & Ferreira, D. (2002).** Molecules of interest. Genistein. *Phytochemistry* **60**, 205-211.
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995).** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097.
- Dong, X., Braun, E. L. & Grotewold, E. (2001).** Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of Arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiol* **127**, 46-57.
- Douglas, C. J. (1996).** Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant. Sci.* **1**, 171-178.
- Douglas, C. J., Hauffe, K. D., Ites-Morales, M. E., Ellard, M., Paszkowski, U., Hahlbrock, K. & Dangi, J. L. (1991).** Exonic sequences are required for elicitor and light activation of a plant defense gene, but promoter sequences are sufficient for tissue specific expression. *Embo J* **10**, 1767-75.
- Dudareva, N., D'Auria, J., Nam, K., Raguso, R. & Pichersky, E. (1998).** Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J.* **14**, 297-304.
- Dumas, B., Legrand, M., Geoffroy, P. & Fritig, B. (1988).** Purification of tobacco O-methyltransferases by affinity chromatography and estimation of the rate of synthesis of the enzymes during hypersensitive reaction to virus infection. *Planta* **176**, 36-41.
- Dwivedi, U. N., Campbell, W. H., Yu, J., Datla, R. S. S., Bugos, R. C., Chiang, V. L. & Podila, G. K. (1994).** Modification of lignin biosynthesis in transgenic *Nicotiana* through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Populus*. *Plant Mol. Biol.* **26**, 61-71.
- Dyer, W. E., Henstrand, J. M., Handa, A. K. & Herrmann, K. M. (1989).** Wounding induces the first enzyme of the shikimate pathway in Solanaceae. *PNAS* **86**, 7370-7373.
- E**
- Ebel, J. & Grisebach, H. (1973).** Reduction of cinnamic acids to cinnamyl alcohols with an enzyme preparation from cell suspension cultures of soybean (*Glycine max*). *FEBS Lett.* **30**, 141-143.
- Ehltig, J., Büttner, D., Wang, Q., Douglas, C. J., Somssich, I. E. & Kombrink, E. (1999).** Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J.* **19**, 9-20.
- Ehltig, J., Shin, J. J. & Douglas, C. J. (2001).** Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant J* **27**, 455-65.
- El Mansouri, I., Mercado, J. A., Santiago-Domenech, N., Pliego-Alfaro, F., Valpuesta, V. & Quesada, M. A. (1999).** Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol. Plant.* **106**, 355-362.
- Elfstrand, M., Sitbon, F., Lapierre, C., Bottin, A. & von Arnold, S. (2002).** Altered lignin structure and resistance to pathogens in spi 2-expressing tobacco plants. *Planta* **214**, 708-16.
- Elkind, Y., Edwards, E., Mavandad, M., Hedrick, S. A., Ribak, O., Dixon, R. A. & Lamb, C. J. (1990).** Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9057-9061.
- Engel, C. & Wierenga, R. (1996).** The diverse world of coenzyme A binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 790-7.
- Erickson, M. & Miksche, G. E. (1974).** On the occurrence of lignin or polyphenols in some mosses and liverworts.

Phytochemistry **13**, 2295-2299.

F

Farmer, M., Czenic, P., Michael, A. & Negrel, J. (1999). Identification and characterization of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco. *Eur. J. Biochem.* **263**, 686-694.

Fengel, D. & Wegener, G. (1984). *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.*: Walter de Gruyter, Berlin.

Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (1999). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* **6**, 775-84.

Feuillet, C., Lauvergeat, V., Deswarte, C., Pilate, G., Boudet, A. & Grima-Pettenati, J. (1995). Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. *Plant Mol Biol* **27**, 651-67.

Fleurence, J. & Negrel, J. (1989). Partial purification of tyramine feruloyl transferase from TMV inoculated tobacco leaves. *Phytochemistry* **28**, 733-736.

Flohe, L. & Schwabe, K. P. (1970). Kinetics of purified catechol-O-methyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **220**, 469-476.

Fraissinet-Tachet, L., Baltz, R., Chong, J., Kauffmann, S., Fritig, B. & Saindrenan, P. (1998). Two tobacco genes induced by infection, elicitor and salicylic acid encode glucosyltransferase acting on phenylpropanoids and benzoic acid derivatives, including salicylic acid. *FEBS Lett.* **437**, 319-323.

Franke, R., Fry, S. C. & Kauss, H. (1998). Low-molecular-weight precursors for defense-related cell wall hydroxycinnamoyl esters in elicited parsley suspension cultures. *Plant Cell Rep.* **17**, 379-383.

Franke, R., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Humphreys, J. M. & Chapple, C. (2002b). Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the *ref8* mutant of Arabidopsis. *Plant J.* **30**, 47-59.

Franke, R., Humphreys, J. M., Hemm, M. R., Denault, J. W., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C. & Chapple, C. (2002a). The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **30**, 33-45.

Franke, R., McMichael, C. M., Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C. & Chapple, C. (2000). Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase. *Plant J* **22**, 223-34.

Frick, S. & Kutchan, T. M. (1999). Molecular cloning and functional expression of O-methyltransferase common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.* **17**, 329-339.

Frick, S., Ounaroon, A. & Kutchan, T. M. (2001). Combinatorial biochemistry in plants: the case of O-methyltransferases. *Phytochemistry* **56**, 1-4.

Friedman, W. E. & Cook, M. E. (2000). The origin and early evolution of tracheids in vascular plants: integration of palaeobotanical and neobotanical data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 857-68.

Fritig, B., Legrand, M. & Hirth, L. (1972). Changes in the metabolism of phenolic compounds during the hypersensitive reaction of tobacco to TMV. *Virology* **47**, 845-848.

Fujiwara, H., Tanaka, Y., Fukui, Y., Ashikari, T., Yamaguchi, M. & Kusumi, T. (1998). Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Science* **137**, 87-94.

G

Gaire, F., Schmitt, A. C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. & Ritzenthaler, C. (1999). Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* **264**, 25-36.

Galliano, H., Heller, W. & Sanderman Jr., H. (1993). Ozone induction and purification of spruce cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Phytochemistry* **32**, 557-563.

Gang, D. R., Beuerle, T., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D. & Pichersky, E. (2002a). 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 Physiol* **130**, 1536-44.

- Gang, D. R., Costa, M. A., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A. T., Wang, H. B., Burlat, V., Martin, W., Sarkanen, S., Davin, L. B. & Lewis, N. G. (1999).** Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chem Biol* **6**, 143-51.
- Gang, D. R., Lavid, N., Zubieta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Noel, J. P. & Pichersky, E. (2002b).** Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family. *Plant Cell* **14**, 505-19.
- Gantet, P. & Memelink, J. (2002).** Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 563-9.
- Geoffroy, P., Legrand, M. & Fritig, B. (1990).** Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**, 327-333.
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V. S., Timko, M. P., Scolnik, P. A. & Cashmore, A. R. (1988).** An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7089-93.
- Goffner, D., Campbell, M. M., Campargue, C., Clastre, M., Borderies, G., Boudet, A. & Boudet, A. M. (1994).** Purification and characterization of cinnamoyl-Coenzyme A:NADP oxidoreductase in *Eucalyptus gunnii*. *Plant Physiol.* **106**, 625-632.
- Goffner, D., Joffroy, I., Grima-Pettenati, J., Halpin, C., Knight, M. E., Schuch, W. & Boudet, A. M. (1992).** Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus xylem*. *Planta* **188**, 48-53.
- Goffner, D., Van Doorselaere, J., Yahiaoui, N., Samaj, J., Grima-Pettenati, J. & Boudet, A. M. (1998).** A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* **36**, 755-765.
- Gorlach, J., Raesecke, H. R., Rentsch, D., Regenass, M., Roy, P., Zala, M., Keel, C., Boller, T., Amrhein, N. & Schmid, J. (1995).** Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3166-70.
- Gowri, G., Bugos, R. C., Campbell, W. H., Maxwell, C. A. & Dixon, R. A. (1991).** Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **97**, 7-14.
- Grace, S. C. & Logan, B. A. (2000).** Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 1499-510.
- Grand, C. (1984).** Ferulic acid 5-hydroxylase: a new cytochrome P-450-dependent enzyme from higher plant microsomes involved in lignin synthesis. *FEBS Lett.* **169**, 7-11.
- Grand, C., Boudet, A. & Boudet, A. M. (1983).** Isoenzymes of hydroxycinnamate: CoA ligase from poplar stems: properties and tissue distribution. *Planta* **158**, 225-229.
- Grimmig, B., Kneusel, R., Junghanns, K. J. & Matern, U. (1999).** Expression of bifunctional caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in stress compensation and lignification. *Plant Biol.* **1**, 299-310.
- Grimmig, B. & Martern, U. (1997).** Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harboring a novel elicitor responsive cis-acting element. *Plant Mol. Biol.* **33**, 323-341.
- Grisebach, H. (1981).** Lignins. In *In Biochemistry of Plants*, pp. 457-478. Edited by P.K. Stumpf & e. N. Y. a. p. E.E. Conn.
- Gross, G. G. (1981).** Phenolic acids. In *The biochemistry of plants: a comprehensive treatise*, pp. 301-316. Edited by E. E. Conn: Academic Press.
- Gross, G. G., Stöckigt, J., Mansell, R. L. & Zenk, M. H. (1973).** Three novel enzymes involved in the reduction of ferulic acid to coniferyl alcohol in higher plants: ferulate:CoA ligase, feruloyl-CoA reductase and coniferyl alcohol oxidoreductase. *FEBS Lett.* **31**, 283-286.
- Grotewold, E., Drummond, B. J., Bowen, B. & Peterson, T. (1994).** The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* **76**, 543-53.
- Grotewold, E., Sainz, M. B., Tagliani, L., Hernandez, J. M., Bowen, B. & Chandler, V. L. (2000).** Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc Natl Acad*

Sci U S A **97**, 13579-84.

Grothe, T., Lenz, R. & Kutchan, T. (2001). Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *J. Biol. Chem.* **276**, 30717-30723.

Guldberg, H. & Marsden, C. (1975). Catechol-O-methyltransferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmac. Rev.* **27**, 135-206.

Guo, D., Chen, F. & Dixon, R. A. (2002). Monolignol biosynthesis in microsomal preparations from lignifying stems of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Phytochemistry* **61**, 657-67.

Guo, D., Chen, F., Inoue, K., Blount, J. W. & Dixon, R. A. (2001). Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa. impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell* **13**, 73-88.

Guyer, D., Patton, D. & Ward, E. (1995). Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4997-5000.

H

Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 347-369.

Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langerbartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmeizer, E., Schreier, P. H., Stocker, R. H. & Stenzel, K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**, 153-156.

Halpin, C., Holt, K., Chojecki, J., Oliver, D., Chabbert, B., Monties, B., Edwards, K., Barakate, A. & Foxon, G. A. (1998). Brown-midrib maize (bm1)--a mutation affecting the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Plant J* **14**, 545-53.

Halpin, C., Knight, M. E., Foxon, G. A., Campbell, M. M., Boudet, A. M., Boon, J. J., Chabbert, B., Tollier, M.-T. & Schuch, W. (1994). Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl-alcohol dehydrogenase. *Plant J.* **6**, 339-350.

Hanson, K. R. (1966). Chlorogenic acid biosynthesis. *Phytochemistry* **5**, 491-499.

Harborne, J. B. (1964). *"Biochemistry of Phenolics Compounds"*: Academic Press, London.

Harborne, J. B. & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.

Harding, S. A., Leshkevich, J., Chiang, V. L. & Tsai, C. J. (2002). Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate:coenzyme a ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. *Plant Physiol* **128**, 428-38.

Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A. & Kay, S. A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* **290**, 2110-3.

Hatfield, R. & Vermerris, W. (2001). Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol* **126**, 1351-7.

Hauffe, K. D., Lee, S. P., Subramaniam, R. & Douglas, C. J. (1993). Combinatorial interactions between positive and negative cis-acting elements control spatial patterns of 4CL-1 expression in transgenic tobacco. *Plant J* **4**, 235-53.

Hawkins, S. W. & Boudet, A. M. (1994). Purification and characterization of cinnamyl alcohol dehydrogenase isoforms from the periderm of *Eucalyptus gunnii* hook. *Plant Physiol.* **104**, 75-84.

He, X. Z. & Dixon, R. A. (2000). Genetic manipulation of isoflavone 7-O-methyltransferase enhances biosynthesis of 4'-O-methylated isoflavonoid phytoalexins and disease resistance in alfalfa. *Plant Cell* **12**, 1689-702.

Hein, D. W., Rustan, T. D., Doll, M. A., Bucher, K. D., Ferguson, R. J., Feng, Y., Furman, E. J. & Gray, K. (1992). Acetyltransferases and susceptibility to chemicals. *Toxicol Lett* **64-65 Spec No**, 123-30.

Hemm, M. R., Herrmann, K. M. & Chapple, C. (2001). AtMYB4: a transcription factor general in the battle against UV. *Trends Plant Sci* **6**, 135-6.

Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R. & Stitt, M. (2001). A small decrease of plastid

transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **13**, 535-51.

Herrmann, K. M. (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell* **7**, 907-919.

Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. (1999). *The shikimate pathway*, Russell L. Jones, University of California, Berkeley edn.

Hibino, T., Takabe, K., Kawazu, T., Shibata, D. & Higuchi, T. (1995). Increase of cinnamaldehyde groups in lignin of transgenic tobacco plants carrying an antisense gene for cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 929-931.

Higuchi, T., Shimada, M., Nakatsubo, F. & Tanahashi, M. (1977). Differences in biosynthesis of guaiacyl and syringyl lignins in woods. *Wood Sci. Technol.* **11**, 153-167.

Hoffmann, L., Maury, S., Bergdoll, M., Thion, L., Erard, M. & Legrand, M. (2001). Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **276**, 36831-8.

Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P. & Legrand, M. (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem* **278**, 95-103.

Howles, P. A., Sewalt, V. J. H., Paiva, N. L., Elkind, Y., Bate, N. J., Lamb, C. & Dixon, R. A. (1996). Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control point for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol.* **1996**, 1617-1624.

Hu, W. J., Kawaoka, A., Tsai, C. J., Lung, J., Osakabe, K., Ebinuma, H. & Chiang, V. L. (1998). Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremeloides*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5407-5412.

Hu, W.-J., Harding, S. A., Lung, J., Popko, J. L., Ralph, J., Stokke, D. D., Tsai, C.-J. & Chiang, V. L. (1999). Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nat. Biotechnol.* **17**, 808-812.

Humphreys, J. M. & Chapple, C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 224-9.

Humphreys, J. M., Hemm, M. R. & Chapple, C. (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10045-10050.

Hurtado-Cabello, F., Durst, F., Jorrin, J. V. & Werck-Reichhart, D. (1997). Coumarins in *Helianthus tuberosus*: characterization, induced accumulation and biosynthesis. *Phytochemistry* **49**, 1029-1036.

I

Ibrahim, R. K. (1977). Glucosylation of lignin precursors by uridine diphosphate glucose:coniferyl alcohol glucosyltransferase in higher plants. *Pflanzenphysiol.* **85**, 253-262.

Ibrahim, R. K. (1997). Plant O-methyltransferase signatures. *Trends Plant. Sci.*, 249-250.

Ibrahim, R. K., Bruneau, A. & Bantignies, B. (1998). Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Mol. Biol.* **36**, 1-10.

Iiyama, K., Lam, T. B.-T. & Stone, B. A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* **104**, 315-320.

Ikegawa, T., Mayama, S., Nakayashiki, H. & Kato, H. (1996). Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **48**, 245-255.

Inoue, K., Sewalt, V. J. H., Ballance, G. M., Ni, W., Stürtzer, C. & Dixon, R. A. (1998). Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiol.* **117**, 761-770.

Ishii, T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* **127**, 111-127.

Ito, H., Hiraga, S., Tsugawa, H., Matsui, H., Honma, M., Otsuki, Y., Murakami, T. & Ohashi, Y. (2000). Xylem-

specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants. *Plant Science* **155**, 85-100.

J

Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A. M., Torronen, R., Karenlampi, S. & Hohtola, A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol* **130**, 729-39.

Jackson, R. G., Lim, E. K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hoggett, J., Ashford, D. A. & Bowles, D. J. (2001). Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem* **276**, 4350-6.

Jaeck, E., Dumas, B., Geoffroy, P., Favet, N., Inze, D., Van Montagu, M., Fritig, B. & Legrand, M. (1992). Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: Induction of O-methyltransferase mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 294-300.

Jaeck, E., Martz, F., Stiefel, V., Fritig, B. & Legrand, M. (1996). Expression of class I O-methyltransferase in healthy and TMV-infected tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 681-688.

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

Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B. & Martin, C. (2000). Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in Arabidopsis. *Embo J* **19**, 6150-61.

Jin, H. & Martin, C. (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* **41**, 577-85.

Jones, A. M. (2001). Programmed Cell Death in Development and Defense. *Plant Physiol.* **125**, 94-97.

Jones, J. D., Henstrand, J. M., Handa, A. K., Herrmann, K. M. & Weller, S. C. (1995). Impaired Wound Induction of 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) Synthase and Altered Stem Development in Transgenic Potato Plants Expressing a DAHP Synthase Antisense Construct. *Plant Physiol* **108**, 1413-1421.

Jones, L. (2002). Revealing micro-RNAs in plants. *Trends Plant Sci* **7**, 473-5.

Jones, L., Ennos, A. R. & Turner, S. R. (2001). Cloning and characterization of irregular xylem4 (irx4): a severely lignin-deficient mutant of Arabidopsis. *Plant J* **26**, 205-16.

Jones, L. C., Okino, S. T., Gonda, T. J. & Whitlock, J. P., Jr. (2002). Myb-binding protein 1a augments AhR-dependent gene expression. *J Biol Chem* **277**, 22515-9.

Jones, T. A., Bergdoll, M. & Kjeldgaard, M. (1989). O : a macromolecular modelling environment; an overview. In *Crystallographic computing and modelling methods in macromolecular design*. Edited by C. Buggs & S. Ealick. New-York: Springer.

Joseleau, J.-P. & Ruel, K. (1997). Study of lignification by non invasives techniques in growing maize internodes. *Plant Physiol.* **114**, 1123-1133.

Joshi, C. P. & Chiang, V. L. (1998). Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol. Biol.* **37**, 663-674.

Jouanin, L., Goujon, T., de Nadai, V., Martin, M. T., Mila, I., Vallet, C., Pollet, B., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Petit-Conil, M. & Lapierre, C. (2000). Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity. *Plant Physiol* **123**, 1363-74.

K

Kaakkola, S. (2000). Clinical pharmacology, therapeutic use and potential of COMT inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs* **59**, 1223-1250.

Kagan, R. M. & Clarke, S. (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* **310**, 417-27.

Kahkonen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T. & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* **47**, 3954-3962.

- Kajita, S., Hishiyama, S., Tomimura, Y., Katayama, Y. & Omori, S. (1997).** Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate:coenzyme A ligase is depressed. *Plant Physiol.* **114**, 871-879.
- Kajita, S., Katayama, Y. & Omori, S. (1996).** Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate:coenzyme A ligase. *Plant Cell Physiol.* **37**, 957-965.
- Kao, Y. Y., Harding, S. A. & Tsai, C. J. (2002).** Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiol* **130**, 796-807.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. & Carrington, J. C. (2003).** P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA uncton. *Dev Cell* **4**, 205-17.
- Kawaoka, A. & Ebinuma, H. (2001).** Transcriptional control of lignin biosynthesis by tobacco LIM protein. *Phytochemistry* **57**, 1149-57.
- Kawaoka, A., Kaothien, P., Yoshida, K., Endo, S., Yamada, K. & Ebinuma, H. (2000).** Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J* **22**, 289-301.
- Keith, B., Dong, X. N., Ausubel, F. M. & Fink, G. R. (1991).** Differential induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase genes in Arabidopsis thaliana by wounding and pathogenic attack. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8821-5.
- Keller, H., Hohfeld, H., Wray, V., Hahlbrock, K., D., S. & Strack, D. (1996).** Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **42**, 389-396.
- Kidner, C. A. & Martienssen, R. A. (2003).** Macro effects of microRNAs in plants. *Trends Genet* **19**, 13-6.
- Kim, H., Ralph, J., Yahiaoui, N., Pean, M. & Boudet, A. M. (2000).** Cross-coupling of hydroxycinnamyl aldehydes into lignins. *Org Lett* **2**, 2197-200.
- Kim, S. H., Kronstad, J. W. & Ellis, B. E. (2001).** Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*. *Phytochemistry* **58**, 849-57.
- Kimmins, W. C. & Wuddah, D. (1977).** Hypersensitive resistance: determination of lignin in leaves with a localized virus infection. *Phytopathology* **67**, 1012-1016.
- Kimura, M., Kaneko, I., Komiyama, M., Takatsuki, A., Koshino, H., Yoneyama, K. & Yamaguchi, I. (1998).** Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101. *J. Biol. Chem.* **273**, 1654-1661.
- Kneusel, R. E., Matern, U. & Nicolay, K. (1989).** Formation of *trans*-caffeoyl-CoA from *trans*-4-coumaroyl-CoA by Zn²⁺-dependent enzymes in cultured plant cells and its activation by an elicitor-induced pH shift. *Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 455-462.
- Koch, U., Kühnl, T., Conradt, W. & Wellmann, E. (1990).** Differential effects of light and fungal elicitor on chlorogenic acid and caffeoylshikimic acid metabolism. *Plant Science* **70**, 167-174.
- Koopmann, E., Logemann, E. & Hahlbrock, K. (1999).** Regulation and functional expression of cinnamate 4-hydroxylase from parsley. *Plant Physiol* **119**, 49-56.
- Korth, K. L., Blount, J. W., Chen, F., Rasmussen, S., Lamb, C. & Dixon, R. A. (2001).** Changes in phenylpropanoid metabolites associated with homology-dependent silencing of phenylalanine ammonia-lyase and its somatic reversion in tobacco. *Physiologia Plantarum* **111**, 137-143.
- Kranz, H. D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R. C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. & Weisshaar, B. (1998).** Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 263-76.
- Kreuzaler, F. & Hahlbrock, K. (1975).** Enzymic synthesis of an aromatic ring from acetate units. Partial purification and some properties of flavanone synthase from cell-suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.* **56**, 205-213.
- Kroon, P. A. & Williamson, G. (1999).** Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**, 355-361.

Kuc, J., Nelson, O. E. & Flanagan, P. (1968). Degradation of abnormal lignins in the brown-midrib mutants and double mutants of maize. *Phytochemistry* **7**, 1435-1436.

Kühnl, T., Koch, U., Heller, W. & Wellmann, E. (1989). Elicitor induced S-adenosyl-L-methionine: caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase from carrot cell suspension cultures. *Plant Sci.* **60**, 21-25.

Kumar, A. & Ellis, B. E. (2001). The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiol* **127**, 230-9.

Kuo, M. H. & Allis, C. D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* **20**, 615-26.

Kutsuki, H., Shimada, M. & Higuchi, T. (1982). Distribution and roles of *p*-hydroxycinnamate:CoA ligase in lignin biosynthesis. *Phytochemistry* **21**, 267-271.

L

Lacombe, E., Hawkins, S., Van Doorselaere, J., Piquemal, J., Goffner, D., Poeydomenge, O., Boudet, A.-M. & Grima-Pettenati, J. (1997). Cinnamoyl-CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant J.* **11**, 429-441.

Lacombe, E., Van Doorselaere, J., Boerjan, W., Boudet, A. M. & Grima-Pettenati, J. (2000). Characterization of cis-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *Plant J* **23**, 663-76.

Lagrimini, L. M. (1991). Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol* **96**, 577-583.

Lagrimini, L. M., Gingas, V., Finger, F., Rothstein, S. & Liu, T. (1997). Characterization of Antisense Transformed Plants Deficient in the Tobacco Anionic Peroxidase. *Plant Physiol* **114**, 1187-1196.

Lagrimini, L. M. & Rothstein, S. (1987). Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* **84**, 438-442.

Lagrimini, L. M., Vaughn, J., Erb, W. A. & Miller, S. A. (1993). Peroxidase overproduction in tomato: wound-induced polyphenol deposition and disease resistance. *HortScience* **28**, 218-221.

Lange, B. M., Lapierre, C. & Sandermann, H., Jr. (1995). Elicitor-induced spruce stress lignin. Structural similarity to early developmental lignins. *Plant Physiology* **108**, 1277-1287.

Lapierre, C. (1986). Thioacidolysis of poplar lignins: identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl rich fractions. *Holzforchung* **40**, 113-118.

Lapierre, C. (1993). Application of new methods for the investigation of lignin structure. In *In Forage Cell Wall Structure and Digestibility*, pp. 133-166. Edited by H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield & e. J. Ralph: American Society Of Agronomy, Madison.

Lapierre, C., Pollet, B., Petit-Conil, M., Toval, G., Romero, J., Pilate, G., Leplé, J.-C., Boerjan, W., Ferret, V., De Nadaï, V. & Jouanin, L. (1999). Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant physiol.* **119**, 153-163.

Lauvergeat, V., Lacomme, C., Lacombe, E., Lasserre, E., Roby, D. & Grima-Pettenati, J. (2001). Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria. *Phytochemistry* **57**, 1187-95.

Lavid, N., Wang, J., Shalit, M., Guterman, I., Bar, E., Beuerle, T., Menda, N., Shafir, S., Zamir, D., Adam, Z., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E. & Lewinsohn, E. (2002). O-methyltransferases involved in the biosynthesis of volatile phenolic derivatives in rose petals. *Plant Physiol* **129**, 1899-907.

Lee, D. & Douglas, C. J. (1996). Two divergent members of a tobacco 4-coumarate: coenzyme A ligase (*4-CL*) gene family. *Plant physiol.* **112**, 193-205.

Lee, D., Meyer, K., Chapple, C. & Douglas, C. J. (1997b). Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in *Arabidopsis* leads to altered lignin subunit composition. *Plant Cell* **9**, 1985-1998.

Lee, J. E., Vogt, T., Hause, B. & Lobler, M. (1997a). Methyl jasmonate induces an O-methyltransferase in barley.

Plant Cell Physiol **38**, 851-62.

Lee, V. W., Jin, S., Sim, W. S. & Nester, E. W. (1995). Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 12245-12249.

Legrand, M. (1983). Phenylpropanoid metabolism and its regulation in disease. In *Biochemical Plant Pathology*, pp. 367-384. Edited by J. A. Callow. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

Legrand, M., Fritig, B. & Hirth, L. (1971). Biosynthèse des acides caféoylquiniques dans les feuilles de Tabac saines ou infectées par le virus de la mosaïque du Tabac. *C.R. Acad. Sc. Paris, Série D* **273**, 525-528.

Legrand, M., Fritig, B. & Hirth, L. (1976b). Catechol O-methyltransferases of tobacco: evidence for several enzymes with *para*- and *meta*-O-methylating activities. *FEBS Lett.* **70**, 131-136.

Legrand, M., Fritig, B. & Hirth, L. (1978). Ortho-diphenol O-methyltransferases of healthy and tobacco-mosaic-virus infected hypersensitive tobacco. *Planta* **144**, 101-108.

Legrand, M., Fritig, F. & Hirth, L. (1976a). Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco to tobacco mosaic virus. *Phytochemistry* **15**, 1353-1359.

Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. & Fritig, B. (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins : four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6750-6754.

Lehfeldt, C., Shirley, A. M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P. V., Strack, D. & Chapple, C. (2000). Cloning of the SNG1 gene of Arabidopsis reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12**, 1295-306.

Leinhos, V., Udagama-Randeniya, P. V. & Savidge, R. A. (1994). Purification of an acid coniferin-hydrolysing β -glucuronidase from developing xylem of *Pinus banksiana*. *Phytochemistry* **37**, 311-315.

Lekse, J. M., Xia, L., Stark, J., Morrow, J. D. & May, J. M. (2001). Plant catechols prevent lipid peroxidation in human plasma and erythrocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **226**, 89-95.

Leuschner, C., Herrmann, K. M. & Schultz, G. (1995). The Metabolism of Quinate in Pea Roots (Purification and Partial Characterization of a Quinate Hydrolyase). *Plant Physiol* **108**, 319-325.

Leuschner, C. & Schultz, G. (1991). Uptake of shikimate pathway intermediates by intact chloroplasts. *Phytochemistry* **30a**, 2203-2207.

Lewis, N. G. (1999). A 20th century roller coaster ride: a short account of lignification. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 153-162.

Li, J., Ou-Lee, T. M., Raba, R., Amundson, R. G. & Last, R. L. (1993). Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.

Li, L., Cheng, X. F., Leshkevich, J., Umezawa, T., Harding, S. A. & Chiang, V. L. (2001). The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase. *Plant Cell* **13**, 1567-86.

Li, L., Osakabe, K., Tsao, C. C., Popko, J. L., Umezawa, T., Carraway, D. T., Smeltzer, R. H., Joshi, C. P. & Chiang, V. L. (1999a). A clarification of syringyl monolignol biosynthesis. In *Forest Biotechnology'99*. Oxford, United Kingdom.

Li, L., Osakabe, Y., Joshi, C. P. & Chiang, V. (1999b). Secondary xylem-specific expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase plays an important role in the methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Plant Mol. Biol.* **40**, 555-565.

Li, L., Popko, J. L., Umezawa, T. & Chiang, V. L. (2000). 5-hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms. *J Biol Chem* **275**, 6537-45.

Li, L., Popko, J. L., Zhang, X.-H., Osakabe, K., Tsai, C.-J., Joshi, C. P. & Chiang, V. L. (1997). A novel multifunctional O-methyltransferase implicated in a dual methylation pathway associated with lignin biosynthesis in loblolly pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5461-5466.

Li, L., Zhou, Y., Cheng, X., Sun, J., Marita, J. M., Ralph, J. & Chiang, V. L. (2003). Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4939-44.

Liang, X., Dron, M., Cramer, C. L., Dixon, R. A. & Lamb, C. J. (1989a). Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *J. Biol. Chem.* **264**, 14486-14492.

Liang, X., Dron, M., Schmid, J., Dixon, R. A. & Lamb, C. J. (1989b). Developmental and environmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase- β -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9284-9288.

Lim, E. K., Doucet, C. J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S. P., Ross, J. & Bowles, D. J. (2002). The activity of Arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *J Biol Chem* **277**, 586-92.

Lim, E. K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D. A. & Bowles, D. J. (2001). Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in Arabidopsis. *J Biol Chem* **276**, 4344-9.

Lindermayr, C., Fliegmann, J. & Ebel, J. (2003). Deletion of a single amino acid residue from different 4-coumarate:CoA ligases from soybean results in the generation of new substrate specificities. *J Biol Chem* **278**, 2781-6.

Lindermayr, C., Mollers, B., Fliegmann, J., Uhlmann, A., Lottspeich, F., Meimberg, H. & Ebel, J. (2002). Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. *Eur J Biochem* **269**, 1304-15.

Logemann, E., Parniske, M. & Hahlbrock, K. (1995). Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5905-9.

Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W., Somssich, I. E. & Hahlbrock, K. (2000). UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1903-7.

Lois, R. (1994). Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in Arabidopsis thaliana L. I. Mechanisms of UV-resistance in Arabidopsis. *Planta* **194**, 498-503.

Lois, R. & Buchanan, B. B. (1994). Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an Arabidopsis mutant deficient in flavonoid accumulation. II. Mechanisms of UV-resistance in Arabidopsis. *Planta* **194**, 504-509.

Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K. & Schultz, W. (1989). A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *EMBO J.* **8**, 1641-1648.

Lüderitz, T. & Grisebach, H. (1981). Enzymic synthesis of lignin precursors. Comparison of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol:NADP⁺ dehydrogenase from spruce (*Picea abies* L.) and soybean (*glycine max* L.). *Eur. J. Biochem.* **119**, 115-124.

Lüderitz, T., Schatz, G. & Grisebach, H. (1982). Enzymatic synthesis of lignin precursors. Purification and properties of 4-coumarate:CoA ligase from cambial sap of spruce (*Picea abies* L.). *Eur J Biochem* **123**, 583-586.

Lundström, K., Salminen, M., Jalanko, A., Savoleinen, R. & Ullmanen, I. (1991). Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA cell Biol.* **10**, 181-189.

M

Macheroux, P., Schmid, J., Amrhein, N. & Schaller, A. (1999). A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta* **207**, 325-34.

MacKay, J. J., O'Malley, D. M., Presnell, T., Booker, F. L. & Campbell, M. M. (1997). Inheritance, gene expression and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8255-8260.

Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A. & Lamb, C. (1994). Increase disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7802-7806.

Marita, J. M., Ralph, J., Hatfield, R. D. & Chapple, C. (1999). NMR characterization of lignin in Arabidopsis altered in the activity of ferulate 5-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12328-12332.

Marita, J. M., Ralph, J., Hatfield, R. D., Guo, D., Chen, F. & Dixon, R. A. (2003). Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry* **62**, 53-65.

- Martin, C. & Paz-Ares, J. (1997).** MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* **13**, 67-73.
- Martz, F. (1997).** Modification de l'activité O-méthyltransférase dans des tabacs transgéniques : conséquences sur la lignine et la résistance au virus de la mosaïque du tabac. pp. 170. Strasbourg: Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Martz, F., Maury, S., Pinçon, G. & Legrand, M. (1998).** cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. *Plant Mol. Biol.* **36**, 427-437.
- Massala, R., Legrand, M. & Fritig, B. (1987).** Comparative effects of two competitive inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase on the hypersensitive resistance of tobacco to tobacco mosaic virus. *Plant Physiol. Biochem.* **25**, 217-225.
- Matsui, N., Chen, F., Yasuda, S. & Fukushima, K. (2000).** Conversion of guaiacyl to syringyl moieties on the cinnamyl alcohol pathway during the biosynthesis of lignin in angiosperms. *Planta* **210**, 831-5.
- Maury, S. (2000).** Etude des O-méthyltransférases de la voie des phénylpropanoïdes chez le tabac et modulation de leur expression dans des tabacs transgéniques: conséquences sur la biosynthèse de la lignine et d'autres composés phénoliques et sur la résistance aux agents pathogènes. pp. 155. Strasbourg: Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Maury, S., Geoffroy, P. & Legrand, M. (1999).** Tobacco O-methyltransferases involved in phenylpropanoid metabolism: the different CCoAOMT and COMT classes have distinct substrate specificities and expression patterns. *Plant Physiol.* **121**, 215-224.
- Mayer, A. M. & Staples, R. C. (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**, 551-65.
- Mayer, M. J., Narbad, A., Parr, A. J., Parker, M. L., Walton, N. J., Mellon, F. A. & Michael, A. J. (2001).** Rerouting the plant phenylpropanoid pathway by expression of a novel bacterial enoyl-CoA hydratase/lyase enzyme function. *Plant Cell* **13**, 1669-82.
- Mc Dougall, G. J., Stewart, D. & Morrison, I. M. (1994).** Cell-wall-bound oxidases from tobacco (*Nicotiana tabacum*) xylem participate in lignin formation. *Planta* **194**, 9-14.
- McCue, K. F. & Conn, E. E. (1989).** Induction of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase activity by fungal elicitor in cultures of *Petroselinum crispum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7374-7.
- Meissner, R. C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H. D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A., Martin, C., Paz-Ares, J., Smeekens, S., Tonelli, C., Weisshaar, B., Baumann, E., Klimyuk, V., Marillonnet, S., Patel, K., Speulman, E., Tissier, A. F., Bouchez, D., Jones, J. J., Pereira, A., Wisman, E. & et al. (1999).** Function search in a large transcription factor gene family in Arabidopsis: assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell* **11**, 1827-40.
- Meng, H. & Campbell, W. H. (1998).** Substrate profiles and expression of caffeoyl coenzyme A and caffeic acid O-methyltransferases in secondary xylem of aspen during seasonal development. *Plant Mol Biol* **38**, 513-20.
- Menkens, A. E., Schindler, U. & Cashmore, A. R. (1995).** The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci* **20**, 506-10.
- Messner, B. & Boll, M. (1993).** Elicitor-mediated induction of enzymes of lignin biosynthesis and formation of lignin-like material in a cell suspension culture of spruce (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* **34**, 261-269.
- Meulwy, P., Mölders, W., Buchala, A. & Métraux, J. P. (1995).** Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. *Plant Physiol.* **109**, 1107-1114.
- Meyer, K., Cusumano, J. C., Somerville, C. & Chapple, C. C. S. (1996).** Ferulate 5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6869-6874.
- Meyer, K., Kohler, A. & Kauss, H. (1991).** Biosynthesis of ferulic acid esters of plant cell wall polysaccharides in endomembranes from parsley cells. *FEBS Lett* **290**, 209-12.
- Meyer, K., Shirley, A. M., Cusumano, J. C., Bell-Lelong, D. A. & Chapple, C. (1998).** Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6619-6623.
- Meyermans, H., Morreel, K., Lapierre, C., Pollet, B., De Bruyn, A., Busson, R., Herdewijn, P., Devreese, B.,**

Van Beeumen, J., Marita, J. M., Ralph, J., Chen, C., Burggraeve, B., Van Montagu, M., Messens, E. & Boerjan, W. (2000). Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *J Biol Chem* **275**, 36899-909.

Mizutani, M., Ohta, D. & Sato, R. (1997). Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from Arabidopsis and its expression manner in planta. *Plant Physiol* **113**, 755-63.

Moniz de Sà, M., Subramaniam, R., Williams, F. E. & Douglas, C. J. (1992). Rapid activation of phenylpropanoid metabolism in elicitor-treated hybrid poplar (*Populus trichorpa* Torr. & Gray X *Populus deltoides* Marsh) suspension-cultured cells. *Plant Physiol* **98**, 728-737.

Monties, B. (1989). Lignins. In *Methods in Plant Biochemistry*, pp. 113-157. Edited by P. M. Dey & J. B. Harborne. London: Academic Press.

Moyano, E., Martinez-Garcia, J. F. & Martin, C. (1996). Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in antirrhinum flowers. *Plant Cell* **8**, 1519-32.

Murray, I. A. & Shaw, W. V. (1997). O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 1-6.

Müsel, G., Schindler, T., Bergfeld, R., Ruel, K., Jacquet, G., Lapierre, C., Speth, V. & Schopfer, P. (1997). Structure and distribution of lignin in primary and secondary walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta* **201**, 146-159.

N

Nair, R. B., Joy, R. W. t., Kurylo, E., Shi, X., Schnaider, J., Datla, R. S., Keller, W. A. & Selvaraj, G. (2000). Identification of a CYP84 family of cytochrome P450-dependent mono-oxygenase genes in Brassica napus and perturbation of their expression for engineering sinapine reduction in the seeds. *Plant Physiol* **123**, 1623-34.

Nair, R. B., Xia, Q., Kartha, C. J., Kurylo, E., Hirji, R. N., Datla, R. & Selvaraj, G. (2002). Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. *Plant Physiol* **130**, 210-20.

Nakashima, J., Takabe, K., Fujita, M. & Saiki, H. (1997). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase activity causes the depression of lignin accumulation of secondary wall thickening in isolated Zinnia mesophyll cells. *Protoplasma* **196**, 99-107.

Nambudiri, A. M., Rao, P. V. & Bhat, J. V. (1970). Metabolism of aromatic compounds by an *Alternaria* species. *Phytochemistry* **9**, 687-693.

Negrel, J. & Smith, T. A. (1984). The phosphohydrolysis of hydroxycinnamoyl-CoA thioesters in plant extracts. *Phytochemistry* **23**, 31-34.

Ni, W., Paiva, N. & Dixon, R. A. (1994). Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid O-methyltransferase antisense gene. *Transgenic Res* **3**, 120-126.

Nicholson, R. L. & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 369-389.

Niemetz, R. & Gross, G. G. (2001). Gallotannin biosynthesis: beta-glucogallin: hexagalloyl 3-O-galloyltransferase from *Rhus typhina* leaves. *Phytochemistry* **58**, 657-61.

Nose, M., Bernards, M. A., Furlan, M., Zajicek, J., Eberhardt, T. L. & Lewis, N. G. (1995). Evidence for sequential biosynthetic steps during lignin polymerisation. *Phytochemistry* **39**, 71-79.

Nutt, J. G. (1998). Catechol O-methyltransferase inhibition and the treatment of Parkinson's disease. *Advances in Pharmacology* **42**, 331-334.

O

O'Connell, A., Holt, K., Piquemal, J., Grima-Pettenati, J., Boudet, A., Pollet, B., Lapierre, C., Petit-Conil, M., Schuch, W. & Halpin, C. (2002). Improved paper pulp from plants with suppressed cinnamoyl-CoA reductase or cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Transgenic Res* **11**, 495-503.

Ohl, S., Hedrick, S. A., Chory, J. & Lamb, C. J. (1990). Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from Arabidopsis. *Plant Cell* **2**, 837-48.

- Olson, P. D. & Varner, J. E. (1993).** Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J* **4**, 887-892.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C. & Katan, M. B. (2001).** Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **131**, 66-71.
- O'Malley, D. M., Porter, S. & Sederoff, R. R. (1992).** Purification, characterization and cloning of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Physiol.* **98**, 1364-1371.
- Onnerud, H., Zhang, L., Gellerstedt, G. & Henriksson, G. (2002).** Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: a new model in lignin biosynthesis I. *Plant Cell* **14**, 1953-62.
- Orr, J. D. & Lynn, D. G. (1992).** Biosynthesis of dehydrodiconiferyl alcohol glucosides: implications for the control of tobacco cell growth. *Plant Physiol.* **98**, 343-352.
- Osakabe, K., Koyama, H., Kawai, S., Katayama, Y. & Morohoshi, N. (1995).** Molecular cloning of two tandemly arranged peroxidase genes from *Populus kitakamiensis* and their differential regulation in the stem. *Plant Mol. Biol.* **28**, 677-689.
- Osakabe, K., Tsao, C. C., Li, L., Popko, J. L., Umezawa, T., Carraway, D. T., Smeltzer, R. H., Joshi, C. P. & Chiang, V. L. (1999).** Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8955-8960.
- Osakabe, Y., Nanto, K., Kitamura, H., Kawai, S., Kondo, Y., Fujii, T., Takabe, K., Katayama, Y. & Morohoshi, N. (1996).** Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase in tissues of *Populus kitakamiensis*. *Planta* **200**, 13-9.
- P**
- Pakusch, A. E., Matern, U. & Schiltz, E. (1991).** Elicitor-inducible caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase from *Petroselinum crispum* cell suspensions. *Plant Physiol.* **95**, 137-143.
- Pakusch, A.-E., Kneusel, R. & Matern, U. (1989).** S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 488-494.
- Pallas, J. A., Paiva, N. L., Lamb, C. & Dixon, R. A. (1996).** Tobacco plants epigenetically suppressed in phenylalanine ammonia-lyase do not develop systemic acquired resistance in response to infection by tobacco mosaic virus. *Plant J.* **10**, 281-293.
- Parvathi, K., Chen, F., Guo, D., Blount, J. W. & Dixon, R. A. (2001).** Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols. *Plant J* **25**, 193-202.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P. A. & Saedler, H. (1987).** The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *Embo J* **6**, 3553-8.
- Pellegrini, L., Rohfritsch, O., Fritig, B. & Legrand, M. (1994).** Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiol* **106**, 877-86.
- Pellegrini, L. O. G., Geoffroy, P., Fritig, B. & Legrand, M. (1993).** Molecular cloning and expression of a new class of ortho-diphenol-O-methyltransferases induced in tobacco leaves by infection or elicitor treatment. *Plant Physiol.* **103**, 509-517.
- Petersen, M., Strack, D. & Matern, U. (1999).** *Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds*. Sheffield: Sheffield Acad. Press Ltd.
- Pichon, M., Courbou, I., Beckert, M., Boudet, A.-M. & Grima-Pettenati, J. (1998).** Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes. *Plant Mol. Biol.* **38**, 671-676.
- Pierrel, M. A. (1999).** Induction du métabolisme aromatique, notamment de la synthèse d'acide salicylique, lors des réponses de défense du Tabac. pp. 151. Strasbourg: Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Pierrel, M. A., Batard, Y., Kazmeier, M., Mignotte-Vieux, C., Durst, F. & Werck-Reichhart, D. (1994).** Catalytic properties of the plant cytochrome P450 CYP73 expressed in yeast. Substrate specificity of a cinnamate hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* **224**, 835-844.

Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple, J. C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E. A., Marstorp, H. G., Hopkins, D. W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D. & Halpin, C. (2002). Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat Biotechnol* **20**, 607-12.

Pinçon, G. (1999). Modulation du métabolisme des phénylpropanoïdes dans des tabacs transgéniques : conséquences sur la biosynthèse de la lignine et la résistance au virus de la mosaïque du tabac. pp. 114. Strasbourg: Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Pinçon, G., Chabannes, M., Lapierre, C., Pollet, B., Ruel, K., Joseleau, J.-P., Boudet, A. M. & Legrand, M. (2001b). Simultaneous down-regulation of caffeic/5-hydroxyferulic acid-O-methyltransferase I and cinnamoyl-coA reductase in the progeny from a cross between tobacco lines homozygous for each transgene. Consequences for plant development and lignin synthesis. *Plant Physiol*. **126**, 145-155.

Pinçon, G., Maury, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B. & Legrand, M. (2001a). Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochemistry* **57**, 1167-1176.

Pinto, J. E. B. P., Dyer, W. E., Weller, S. C. & Herrmann, K. M. (1988). Glyphosate induces 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase in Potato (*Solanum tuberosum* L.) cells grown in suspension culture. *Plant Physiol* **87**, 891-893.

Piquemal, J., Chamayou, S., Nadaud, I., Beckert, M., Barriere, Y., Mila, I., Lapierre, C., Rigau, J., Puigdomenech, P., Jauneau, A., Digonnet, C., Boudet, A. M., Goffner, D. & Pichon, M. (2002). Down-regulation of caffeic Acid o-methyltransferase in maize revisited using a transgenic approach. *Plant Physiol* **130**, 1675-85.

Piquemal, J., Lapierre, C., Myton, K., O'Connell, A., Schuch, W., Grima-Pettenati, J. & Boudet, A. M. (1998). Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant J*. **13**, 71-83.

Q

Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F. J., de Forchetti, S. M., Tigier, H. & Valpuesta, V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* **122**, 1119-27.

R

Ralph, J., Hatfield, R., Piquemal, J., Yahiaoui, N., Pean, M., Lapierre, C. & Boudet, A. M. (1998). NMR characterization of altered lignins extracted from tobacco plants down-regulated for lignification enzymes cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12803-12808.

Ralph, J., Kim, H., Peng, J. & Lu, F. (1999a). Arylpropane-1,3-diols in lignins from normal and CAD-deficient pines. *Org Lett* **1**, 323-6.

Ralph, J., Lapierre, C., Lu, F., Marita, J. M., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Boerjan, W. & Jouanin, L. (2001b). NMR evidence for benzodioxane structures resulting from incorporation of 5-hydroxyconiferyl alcohol into Lignins of O-methyltransferase-deficient poplars. *J Agric Food Chem* **49**, 86-91.

Ralph, J., Lapierre, C., Marita, J. M., Kim, H., Lu, F., Hatfield, R. D., Ralph, S., Chapple, C., Franke, R., Hemm, M. R., Van Doorselaere, J., Sederoff, R. R., O'Malley, D. M., Scott, J. T., MacKay, J. J., Yahiaoui, N., Boudet, A., Pean, M., Pilate, G., Jouanin, L. & Boerjan, W. (2001a). Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* **57**, 993-1003.

Ralph, J., MacKay, J. J., Hatfield, R. D., O'Malley, D. M., Whetten, R. W. & Sederoff, R. R. (1997). Abnormal lignin in a loblolly pine mutant. *Science* **277**, 235-239.

Ralph, J., Peng, J., Lu, F., Hatfield, R. D. & Helm, R. F. (1999b). Are lignins optically active? *J Agric Food Chem* **47**, 2991-6.

Ranocha, P., Chabannes, M., Chamayou, S., Danoun, S., Jauneau, A., Boudet, A. M. & Goffner, D. (2002). Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol* **129**, 145-55.

Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A. M. & Goffner, D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases --- a divergent gene family --- in poplar. *Eur. J. Biochem.* **259**, 485-495.

Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A. M. & Baulcombe, D. C. (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of

gene function by silencing. *Plant J.* **25**, 237-245.

Rexen, B. (1977). Enzyme solubility- a method for evaluating the digestibility of alkali-treated straw. *Animal Feed Sci. Technol.* **2**, 205-218.

Rhodes, M. & Woollorton, L. (1976). The enzymatic conversion of hydroxycinnamic acids to p-coumarylquinic and chlorogenic acids in tomato fruits. *Phytochemistry* **15**, 947-951.

Rhodes, M., Woollorton, L. & Lourenço, E. (1979). Purification and properties of hydroxycinnamoyl CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase from potatoes. *Phytochemistry* **18**, 1125-1129.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G. (1997). Antioxydant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.

Richardson, A., Duncan, J. & McDougall, G. J. (2000). Oxidase activity in lignifying xylem of a taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase. *Tree Physiol* **20**, 1039-47.

Ride, J. P. (1975). Lignification in wounded wheat leaves in response to fungi and its possible role in resistance. *Physiol. Plant Pathol.* **5**, 125-134.

Rizhsky, L., Liang, H. & Mittler, R. (2002). The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol* **130**, 1143-51.

Ro, D. K., Ehling, J. & Douglas, C. J. (2002). Cloning, Functional Expression, and Subcellular Localization of Multiple NADPH-Cytochrome P450 Reductases from Hybrid Poplar. *Plant Physiol* **130**, 1837-51.

Ro, D. K., Mah, N., Ellis, B. E. & Douglas, C. J. (2001). Functional characterization and subcellular localization of poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol* **126**, 317-29.

Roberts, K. & McCann, M. C. (2000). Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 517-22.

Robertsen, B. & Svalheim, O. (1990). The nature of lignin-like compounds in cucumber hypocotyls induced by α -1,4-linked oligogalacturonides. *Physiol. Plant.* **79**, 512-518.

Rösler, J., Krekel, F., Amrhein, N. & Schmid, J. (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* **113**, 175-179.

Ruegger, M. & Chapple, C. (2001). Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in *Arabidopsis thaliana* define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. *Genetics* **159**, 1741-9.

Ruegger, M., Meyer, K., Cusumano, J. C. & Chapple, C. (1999). Regulation of ferulate-5-hydroxylase expression in *Arabidopsis* in the context of sinapate ester biosynthesis. *Plant Physiol.* **119**, 101-110.

Ruel, K., Chabannes, M., Boudet, A., Legrand, M. & Joseleau, J. (2001). Reassessment of qualitative changes in lignification of transgenic tobacco plants and their impact on cell wall assembly. *Phytochemistry* **57**, 875-82.

Ruelland, E., Campalans, A., Selman-Housein, G., Puigdomènech, P. & Rigau, J. (2003). Cellular and subcellular localization of the lignin biosynthetic enzymes caffeic acid-O-methyltransferase, cinnamyl alcohol dehydrogenase and cinnamoyl-coenzyme A reductase in two monocots, sugarcane and maize. *Physiologia Plantarum* **117**, 93-99.

Ruiz, M. T., Voinnet, O. & Baulcombe, D. C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937-46.

Ruottinen, H. & Rinne, U. (1998). COMT inhibition in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol* **245**, 25-34.

Ryser, U., Schorderet, M., Zhao, G. F., Studer, D., Ruel, K., Hauf, G. & Keller, B. (1997). Structural cell wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycin-rich protein. *Plant J.* **12**, 97-111.

S

Sablowski, R. W., Moyano, E., Cullianez-Macia, F. A., Schuch, W., Martin, C. & Bevan, M. (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *Embo J* **13**, 128-37.

Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815.

- Salminen, M., Lundström, K., Tilgmann, C., Savoleinen, R., Kalkkinen, N. & Ulmanen, I. (1990).** Molecular cloning and characterization of rat liver catechol O-methyltransferase. *Gene* **93**, 241-247.
- Samaj, J., Hawkins, S., Lauvergeat, V., Grima-Pettenati, J. & Boudet, A. (1998).** Immunolocalization of cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD 2) indicates a good correlation with cell-specific activity of CAD 2 promoter in transgenic poplar shoots. *Planta* **204**, 437-443.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sarni, F., Grand, C. & Boudet, A. M. (1984).** Purification and properties of cinnamoyl-CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase from poplar stems (*Populus X euramericana*). *Eur. J. Biochem.* **139**, 259-265.
- Sato, Y., Watanabe, T., Komamine, A., Hibino, T., Shibata, D., Sugiyama, M. & Fukuda, H. (1997).** Changes in the activity and mRNA of cinnamyl alcohol dehydrogenase during tracheary element differentiation in zinnia. *Plant Physiol* **113**, 425-30.
- Sato, Y., Wuli, B., Sederoff, R. & Whetten, R. (2001).** Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant res.* **114**, 147-155.
- Schluckebier, G., Kozak, M., Bleimling, N., Weinhold, E. & Saenger, W. (1997).** Differential binding of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and Sinefungin to the adenine-specific DNA methyltransferase M.TaqI. *J Mol Biol* **265**, 56-67.
- Schmid, J. & Amrhein, N. (1995).** Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* **39**, 737-749.
- Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Strack, D. & Rosahl, S. (1999).** Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *Biol. Chem.* **274**, 4273-4280.
- Schmidt, C. L., Danneel, H.-J., Schultz, G. & Buchanan, B. B. (1990).** Shikimate kinase from spinach chloroplasts; purification, characterization, and regulatory function in aromatic amino acid biosynthesis. *Plant Physiol* **93**, 758-766.
- Schmitt, D., Pakush, A.-E. & Matern, U. (1991).** Molecular cloning, induction, and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *J. Biol. Chem.* **266**, 17416-17423.
- Schoch, G., Goepfer, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P. & Werck-Reichhart (2001).** CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 36566-36574.
- Schoch, G. A., Nikov, G. N., Alworth, W. L. & Werck-Reichhart, D. (2002).** Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid in elicited cells. *Plant Physiol* **130**, 1022-31.
- Schroder, G., Wehinger, E. & Schroder, J. (2002).** Predicting the substrates of cloned plant O-methyltransferases. *Phytochemistry* **59**, 1-8.
- Schröder, J. & Schröder, G. (1990).** Stilbene and chalcone synthases: related enzymes with key functions in plant-specific pathways. *Z. Naturforsch.* **45**, 1-8.
- Schuler, M. A. (1996).** Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**, 235-284.
- Sederoff, R. R., MacKay, J. J., Ralph, J. & Hatfield, R. D. (1999).** Unexpected variation in lignin. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 145-152.
- Serino, L., Reimann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P. & Haas, D. (1995).** Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* **249**, 217-28.
- Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. G., Masoud, S. A., Howles, P. A., Lamb, C. & Dixon, R. A. (1997a).** Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiol.* **115**, 41-50.
- Sewalt, V. J. H., Ni, W., Jung, H. G. & Dixon, R. A. (1997b).** Lignin impact on fiber degradation: increased enzymatic digestibility of genetically engineered tobacco (*Nicotiana tabacum*) stems reduced in lignin content. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1977-1983.
- Shalit, M., Guterman, I., Volpin, H., Bar, E., Tamari, T., Menda, N., Adam, Z., Zamir, D., Vainstein, A., Weiss, D., Pichersky, E. & Lewinsohn, E. (2003).** Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme a.

- Geraniol/Citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiol* **131**, 1868-76.
- Shaw, W. V. & Leslie, A. G. (1991)**. Chloramphenicol acetyltransferase. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **20**, 363-86.
- Shirley, B. (1996)**. Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends Plant Sci.* **1**, 377-382.
- Skinner, M., Puvathingal, J., Wajter, R. & Friedman, A. (2000)**. Crystal structure of protein isoaspartyl methyltransferase: a catalyst for protein repair. *Structure* **8**, 1189-1201.
- Solano, R., Nieto, C., Avila, J., Canas, L., Diaz, I. & Paz-Ares, J. (1995)**. Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from *Petunia hybrida*. *Embo J* **14**, 1773-84.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J. N. & Koes, R. (2000)**. anthocyanin1 of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**, 1619-32.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P. E., Hussain, E. A., Damayanti-Wood, B. I. & Farnsworth, N. R. (2001)**. Chemical composition and potential health effects of prunes: a functional food? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **41**, 251-286.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M. & Zambryski, P. (1985)**. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**, 624-629.
- Sterjiades, R., Dean, J. F. D., gamble, G., Himmelsbach, D. S. & Eriksson, K. E. L. (1993)**. Extracellular laccases and peroxidases from sycamore map (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures. Reactions with monolignols and lignin compounds. *Planta* **201**, 75-87.
- Stewart, D., Yahiaoui, N., Mc Dougall, G. J., Myton, K., Marque, C., Boudet, A. M. & Haigh, J. (1997)**. Fourier-transform infrared and Raman spectroscopic evidence for the incorporation of cinnamaldehydes into the lignin of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants with reduced expression of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Planta* **201**, 311-318.
- Stöckigt, J. & Zenk, H. (1974)**. Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. *Phytochemistry* **42**, 131-134.
- Stöckigt, J. & Zenk, M. H. (1975)**. Chemical synthesis and properties of hydroxycinnamoyl-CoA derivatives. *Z. Naturforsch* **30c**, 352-358.
- St-Pierre, B. & De Luca, V. (2000)**. Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferase involved in secondary metabolism. *Recent Adv. Phytochem.* **34**, 285-315.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A. & De Luca, V. (1998)**. The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.* **14**, 703-713.
- Strack, D. & Gross, W. (1990)**. Properties and activity changes of chlorogenic acid: glucaric acid caffeoyltransferase from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Physiol.* **92**, 41-47.
- Stracke, R., Werber, M. & Weisshaar, B. (2001)**. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 447-56.
- Stuible, H., Buttner, D., Ehling, J., Hahlbrock, K. & Kombrink, E. (2000)**. Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. *FEBS Lett* **467**, 117-22.
- Sturley, S. L. (1997)**. Molecular aspects of intracellular sterol esterification: the acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase reaction. *Curr Opin Lipidol* **8**, 167-73.
- Suelves, M. & Puigdomènech, P. (1998)**. Specific mRNA accumulation of a gene coding for an O-methyltransferase in almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) flower tissues. *Plant Sci.* **134**, 79-88.
- Suzuki, H., Nakayama, T. & Nishino, T. (2003)**. Proposed mechanism and functional amino acid residues of malonyl-CoA:anthocyanin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase from flowers of *Salvia splendens*, a member of the versatile plant acyltransferase family. *Biochemistry* **42**, 1764-71.
- Suzuki, H., Nakayama, T., Yonekura-Sakakibara, K., Fukui, Y., Nakamura, N., Nakao, M., Tanaka, Y., Yamaguchi, M. M., Kusumi, T. & Nishino, T. (2001)**. Malonyl-CoA:Anthocyanin 5-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase from scarlet sage (*Salvia splendens*) flowers. Enzyme purification, gene cloning, expression,

and characterization. *J. Biol. Chem.*

T

Tacke, E., Korfhage, C., Michel, D., Maddaloni, M., Motto, M., Lanzini, S., Salamini, F. & Doring, H. P. (1995). Transposon tagging of the maize Glossy2 locus with the transposable element En/Spm. *Plant J* **8**, 907-17.

Taira, M., Evrard, J. L., Steinmetz, A. & Dawid, I. B. (1995). Classification of LIM proteins. *Trends Genet* **11**, 431-2.

Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Cullianez-Macia, F. A., Roberts, K. & Martin, C. (1998a). The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* **10**, 135-154.

Tamagnone, L., Merida, A., Stacey, N., Plaskitt, K., Parr, A., Chang, C.-F., Lynn, D., Dow, J. M., Roberts, K. & Martin, C. (1998b). Inhibition of phenolic acid metabolism results in precocious cell death and altered cell morphology in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **10**, 1801-1816.

Tanguy, J. & Martin, C. (1972). Phenolic compounds and the hypersensitivity reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. *Phytochemistry* **11**, 19-28.

Tanner, K. G., Trievel, R. C., Kuo, M. H., Howard, R. M., Berger, S. L., Allis, C. D., Marmorstein, R. & Denu, J. M. (1999). Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J Biol Chem* **274**, 18157-60.

Terashima, N., Fukushima, K., Sano, Y. & Takabe, K. (1988). Heterogeneity in formation of lignin. Visualization of lignification process in differentiating xylem of pine by microautoradiography. *Holzforschung* **42**, 347-350.

Teutonico, R. A., Dudley, M. W., Orr, J. D., Lynn, D. G. & Binns, A. (1991). Activity and accumulation of cell division-promoting phenolics in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **97**, 288-297.

Teutsch, H. G., Hasenfratz, M. P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J. M., Jeltsch, J. M., Durst, F. & Werck-Reichhart, D. (1993). Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 4102-4106.

Thompson, S., Mayerl, F., Peoples, O. P., Masamune, S., Sinskey, A. J. & Walsh, C. T. (1989). Mechanistic studies on beta-ketoacyl thiolase from *Zoogloea ramigera*: identification of the active-site nucleophile as Cys89, its mutation to Ser89, and kinetic and thermodynamic characterization of wild-type and mutant enzymes. *Biochemistry* **28**, 5735-42.

Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H. & Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**, 129-38.

Toquin, V., Grausem, B., Geoffroy, P. & Legrand, M. (2003). Structure of the tobacco caffeic acid O-methyltransferase (COMT) II gene: identification of promoter sequences involved in gene inducibility by various stimuli. *Plant Molecular Biology sous presse*, 15.

Tsai, C.-J., Popko, J. L., Mielke, M. R., Hu, W.-J., Podila, G. K. & Chiang, V. L. (1998). Suppression of O-methyltransferase gene by homologous sense transgene in quaking aspen causes red-brown wood phenotypes. *Plant Physiol.* **117**, 101-112.

U

Uimari, A. & Strommer, J. (1997). Myb26: a MYB-like protein of pea flowers with affinity for promoters of phenylpropanoid genes. *Plant J* **12**, 1273-84.

Ulbrich, B. & Zenk, M. (1979). Partial purification and properties of hydroxycinnamoyl-CoA: quinate hydroxycinnamoyl transferase from higher plants. *Phytochemistry* **18**, 929-933.

Ulbrich, B. & Zenk, M. (1980). Partial purification and properties of *p*-hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate-*p*-hydroxycinnamoyltransferase from higher plants. *Phytochemistry* **19**, 1625-1629.

V

Van Doorselaere, J., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M. T., Petit-Conil, M., Leplé, J. C., Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inzé, D., Boerjan, W. & Jouanin, L. (1995). A novel lignin in

poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant J.* **8**, 855-864.

Vance, C. P., Kirk, T. K. & Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**, 259-288.

Vidgren, J., Svensson, L. A. & Liljas, A. (1994). Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* **368**, 354-357.

Vignols, F., Rigau, J., Torres, M. A., Capellades, M. & Puigdomenech, P. (1995). The brown midrib (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase. *Plant Cell* **7**, 407-416.

Villegas, R. J. A. & Kojima, M. (1986). Purification and Characterization of Hydroxycinnamoyl D-Glucose. Quinate hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, Ipomoea batatas Lam. *J. Biol. Chem.* **261**, 8729-8733.

Villegas, R. J. A., Shimokawa, T., Okuyama, H. & Kojima, M. (1987). Purification and characterization of chlorogenic acid: Chlorogenate caffeoyl transferase in sweet potato roots. *Phytochemistry* **26**, 1577-1581.

Vogt, T. & Jones, P. (2000). Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci* **5**, 380-6.

Voinnet, O. & Baulcombe, D. C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**, 553.

W

Walker, K. & Croteau, R. (2000a). Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from Taxus and functional expression in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 583-7.

Walker, K. & Croteau, R. (2000b). Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA:taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from taxus and functional expression in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13591-6.

Walker, K., Fujisaki, S., Long, R. & Croteau, R. (2002b). Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12715-20.

Walker, K., Long, R. & Croteau, R. (2002a). The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from Taxus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9166-71.

Walker, K., Schoendorf, A. & Croteau, R. (2000). Molecular cloning of a taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol-O-acetyl transferase cDNA from Taxus and functional expression in Escherichia coli. *Arch Biochem Biophys* **374**, 371-80.

Wallace, G. & Fry, S. C. (1999). Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry* **52**, 769-773.

Walter, M. H. (1992). Regulation of lignification in defense. In *Plant gene research: genes involved in plant defense*, pp. 327-352. Edited by T. Boller & F. Meins: Springer Verlag.

Weaver, L. M. & Herrmann, K. M. (1997). Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* **2**, 346-351.

Weisshaar, B. & Jenkins, G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 251-257.

Wengenmayer, H., Ebel, J. & Grisebach, H. (1976). Enzymic synthesis of lignin precursors. *Eur. J. Biochem.* **65**, 529-536.

Whetten, R. & Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1001-1013.

Whetten, R. W., MacKay, J. J. & Sederoff, R. R. (1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 585-609.

Whitbred, J. M. & Schuler, M. A. (2000). Molecular characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 genes involved in plant defense in pea. *Plant Physiol* **124**, 47-58.

White, H. L. & Wu, J. C. (1975). Properties of catechol-O-methyltransferases from brain and liver of rat and human. *Biochem. J.* **145**, 135-143.

Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to

synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-5.

Wilson, M. A., Sawyer, J., Hatcher, P. G. & Lerch III, H. E. (1989). 1,3,5-Hydroxybenzene structures in mosses. *Phytochemistry* **28**, 1395-1400.

Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 218-23.

Wu, D. & Hersh, L. B. (1994). Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. *J Neurochem* **62**, 1653-63.

X

Xia, Y., Nikolau, B. J. & Schnable, P. S. (1996). Cloning and characterization of CER2, an Arabidopsis gene that affects cuticular wax accumulation. *Plant Cell* **8**, 1291-304.

Y

Yahiaoui, N., Marque, C., Myton, K. E., Negrel, J. & Boudet, A. M. (1998). Impact of different level of cinnamyl alcohol dehydrogenase down-regulation on lignins of transgenic tobacco plants. *Planta* **204**, 8-15.

Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. A. & Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* **103**, 315-321.

Yamauchi, K., Yasuda, S., Hamada, K., Tsutsumi, Y. & Fukushima, K. (2003). Multiform biosynthetic pathway of syringyl lignin in angiosperms. *Planta* **216**, 496-501.

Yang, Q., Grimmig, B. & Matern, U. (1998). Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase gene from carnatio : rapid elicitation of transcription and promoter analysis. *Plant Mol. Biol.* **38**, 1201-1214.

Yang, Q., Rheihard, K., Schlitz, E. & Matern, U. (1997). Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA : anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Mol. Biol.* **35**, 777-789.

Yao, K., De Luca, V. & Brisson, N. (1995). Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* **7**, 1787-1799.

Ye, Z.-H. (1997). Association of caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants. *Plant Physiol.* **115**, 1341-1350.

Ye, Z. H., Zhong, R., Morrison, W. H., 3rd & Himmelsbach, D. S. (2001). Caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase and lignin biosynthesis. *Phytochemistry* **57**, 1177-85.

Ye, Z.-H., Kneusel, R. E., Matern, U. & Varner, J. E. (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell* **6**, 1427-1439.

Ye, Z.-H. & Varner, J. (1995). Differential expression of two O-methyltransferases in lignin biosynthesis in *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* **108**, 459-467.

Z

Zenk, M. H. (1979). *Recent work on cinnamoyl CoA derivatives*. New York: Plenum Press.

Zhang, X., Zhou, L. & Cheng, X. (2000). Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *EMBO J* **19**, 3509-3519.

Zhong, R., Morrison, W. H., 3rd, Himmelsbach, D. S., Poole, F. L., 2nd & Ye, Z. H. (2000). Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiol* **124**, 563-78.

Zhong, R., Morrison, W. H., Negrel, J. & Ye, Z. H. (1998). Dual methylation pathway in lignin biosynthesis. *Plant Cell* **10**, 2033-2046.

Zubieta, C., He, X.-Z., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2001). Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 271-279.

Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J. L., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2002). Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. *Plant Cell* **14**, 1265-77.

Le **métabolisme des phénylpropanoïdes** est un métabolisme secondaire spécifique au règne végétal. Il conduit, à partir de la phénylalanine, à la synthèse d'une grande variété de substances telles que les anthocyanes, les isoflavonoïdes, les stilbènes, des esters d'acides hydroxycinnamiques, ou encore à la lignine. Ces métabolites secondaires interviennent dans la pigmentation florale ou encore la protection des tissus végétaux contre divers stress biotiques et abiotiques. Quant à la **lignine**, elle assure rigidité aux parois cellulaires végétales et imperméabilité aux tissus conducteurs. La lignine est un polymère tridimensionnel constitué de trois unités monomériques qui possèdent le même squelette carboné phénylpropane mais différent par leur degré de méthylation et d'hydroxylation. Une partie de mon travail de thèse a consisté à étudier la relation structure/fonction de la **caféoyl-coenzyme A O-méthyltransférase** (CCoAOMT) de *N. tabacum*, responsable de l'introduction de la première des deux fonctions méthyles. Des études bioinformatiques couplées à des approches de biochimie et de mutagenèse dirigée, nous ont permis de modéliser l'interaction de la CCoAOMT avec son substrat, le caféoyl-CoA. Trois acides aminés du site actif ont notamment été identifiés comme intervenant dans la reconnaissance spécifique de la chaîne latérale de CoA. J'ai également caractérisé, chez *N. tabacum*, une nouvelle acyltransférase à activité **HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase** (HCT) impliquée dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Nous avons montré que l'enzyme HCT recombinante synthétisait, *in vitro*, les substrats de l'hydroxylation en position 3 du noyau aromatique. De plus, la répression de l'expression du gène *HCT* par le «VIGS» conduit à un ralentissement de la croissance des plantes, à une perturbation importante du pool d'acide chlorogénique, ainsi qu'à une diminution de la quantité et à une modification de la composition de la lignine synthétisée.

Mots clés : phénylpropanoïdes, lignine, O-méthyltransférase, modélisation, mutagenèse dirigée, acyltransférase, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, Virus Induced Gene Silencing (VIGS), VMT, CLHP, immunolocalisation, histochimie, microscopie confocale, esters d'acides quinique et shikimique, esters de CoA, acide chlorogénique, *Arabidopsis thaliana*.

I have studied two enzymes involved in phenylpropanoid metabolism in plants. The phenylpropanoid pathway leads from phenylalanine, to a large array of compounds involved in the development and interactions with the environment. Among these products are flower pigments, antibiotics (termed phytoalexins) that accumulate in diseased plants, signals implicated in the recognition of microbes, UV irradiation protectants, and the building units of lignin. Lignin is an essential component of wood that provides rigidity to cell walls and impermeability to vascular tissues. It is a three-dimensional polymer comprising three units having in common the same aromatic ring but differing in their degree of methylation and hydroxylation. Caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase (CCoAOMT) is the first of the two *O*-methyltransferase involved in lignin biosynthesis. This enzyme uses specifically CoA-esters as substrates. My initial work was to characterize the active site of CCoAOMT taking advantage of the fact that animal catechol *O*-methyltransferases and plant CCoAOMT share about 20% amino acid sequence identity and display common structural features. The crystallographic structure of rat liver catechol *O*-methyltransferase was used as a template to construct a homology model for tobacco CCoAOMT. Integrating site-directed mutagenesis and substrate specificity data, the three-dimensional model identified several amino acid residues involved in CoA-esters binding. I also characterized a new acyltransferase named hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase (HCT) involved in phenylpropanoid metabolism. HCT belongs to a plant acyltransferase gene family, the members of which have various functions. *In vitro*, HCT catalyzed the synthesis of shikimate and quinate esters, shown to be substrates of the cytochrome P450 3-hydroxylase. Finally, I confirmed by spatio temporal analyses and virus-induced gene silencing approach the involvement of HCT in lignin biosynthesis.