



**HAL**  
open science

# Etude de la régulation du métabolisme monocarboné chez *Arabidopsis thaliana*

Karen Loizeau

► **To cite this version:**

Karen Loizeau. Etude de la régulation du métabolisme monocarboné chez *Arabidopsis thaliana*.  
Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00424614

**HAL Id: tel-00424614**

**<https://theses.hal.science/tel-00424614>**

Submitted on 16 Oct 2009

**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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
-GRENOBLE I-**

spécialité  
**BIOLOGIE CELLULAIRE**

présentée par  
**Karen LOIZEAU**

pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I**

**ETUDE DE LA REGULATION DU  
METABOLISME MONOCARBONE CHEZ  
*ARABIDOPSIS THALIANA***

**Dirigée par Stéphane RAVANEL**

soutenue le lundi 28 septembre 2009 devant le jury composé de :

Jean-François BRIAT  
Dominique ROLIN  
Françoise VEDELE  
Dominique VAN DER STRAETEN  
Uwe SCHLATTNER  
Stéphane RAVANEL

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse



## **Avant-propos**

*Ce travail n'aurait pu être effectué sans l'accord, le soutien et l'aide de plusieurs personnes.*

*Je tiens à remercier Mme Maryline VANTARD, directrice du Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, ainsi que Fabrice REBEILLE, responsable de l'équipe folate, qui m'ont accueilli et fourni le cadre nécessaire à la réalisation de cette thèse.*

*J'exprime ma plus vive gratitude à Stéphane RAVANEL, pour la confiance qu'il m'a accordé, pour son accueil et son encadrement exceptionnel durant toute la durée de cette thèse. Merci de m'avoir donné le goût de la recherche alors qu'en Master 1 je venais "juste pour voir ce que c'est". Et surtout merci pour vous être toujours montré si disponible et patient (je sais que ce n'est pas toujours évident).*

*J'adresse évidemment mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont accepté de juger mon travail: Mr Uwe SCHLATTNER (professeur, Université Grenoble I), Mr Jean-François BRIAT (Directeur de recherche, CNRS Montpellier), Mr Dominique ROLIN (Professeur, Université Bordeaux 2), Mme Dominique VAN DER STRAETEN (Professeur, Université de Gand, Belgique) ainsi que Mme Françoise VEDELE (Directeur de recherche, INRA Versailles).*

*Je pense également à tous les membres du laboratoire LPCV qui m'ont apporté leur aide ou qui ont contribué à créer une ambiance agréable aussi bien durant le travail qu'en dehors et notamment Sophie, Adeline, Matthieu, Djeneb, Valérie, Julie, Juliette, Christophe, Jérémie ...*

*Je tiens particulièrement à remercier Mme Bernadette GAMBONNET qui m'a soutenue et m'a apporté une aide technique et morale plus que précieuse et ce depuis mon stage de Master 1.*

*Emma, nous nous connaissons depuis maintenant dix ans, tu sais donc que je n'en serai pas là sans toi ...*

*Merci à tous ceux qui, durant toutes ces années, m'ont tant apporté !!!*



## ABBREVIATIONS

(d)AMP	(désoxy) adénosine monophosphate
(d)CMP	(désoxy) cytidine monophosphate
(d)GMP	(désoxy) guanosine monophosphate
(d)TMP	(désoxy) thymidine monophosphate
(d)UMP	(désoxy) uridine monophosphate
5-FCL	5-formyltétrahydrofolate cycloligase
ACC	acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ACP	acyl carrier protein
ADC	aminodéoxychorismate
ADN(c)	acide désoxyribonucléique (complémentaire)
AFTN	anomalies de fermeture du tube neural
AICAR	aminoimidazol-4-carboxamide ribonucléotide
ARN (m)	acide ribonucléique (messenger)
ARN (t)	acide ribonucléique (transporteur)
ATP	adénine triphosphate
C1	monocarboné
CATMA	complete Arabidopsis transcriptome micro-array
CBL	cystathionine $\beta$ -lyase
CGS	cystathionine $\gamma$ -synthase
DHF	dihydrofolate
DHFR	dihydrofolate réductase
DHPS	dihydroptéroate synthase
FPGS	folylpolyglutamate synthétase
FSH	famille des sérine-hydrolases
FTHFS	10-formyl-tétrahydrofolate synthétase
GAR	glycinamide ribonucléotide
GCHI	GTP cyclohydrolase I
GDC	glycine décarboxylase
GGH	$\gamma$ -glutamyl hydrolase
GTP	guanosine triphosphate
Hcy	homocystéine
HMT	homocystéine méthyltransférase
HPPK	hydroxyméthyl-dihydroptérine pyrophosphokinase
IMP	inosine monophosphate
KO	knock-out
MGL	méthionine $\gamma$ -lyase
MIG1	methotrexate induced gene 1
MIL1	methotrexate induced gene like 1
MMT	méthionine <i>S</i> -méthyltransférase
MS	méthionine synthase

MTHFC	méthylènetétrahydrofolate cyclohydrolase
MTHFD	méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase
MTHFR	méthylènetétrahydrofolate réductase
MTX	méthotrexate
OPH	<i>O</i> -phosphohomosérine
<i>p</i> -ABA	acide <i>para</i> -aminobenzoïque
PCR	polymerase chain reaction
PGH	<i>para</i> -aminobenzoylglutamate hydrolase
PTAR	ptérine aldéhyde réductase
RMN	résonance magnétique nucléaire
Rubisco	ribulose 1,5 biphosphate carboxylate / oxygénase
SAH	<i>S</i> -adénosylhomocystéine
SAHH	<i>S</i> -adénosylhomocystéine hydrolase
SAM	<i>S</i> -adénosylméthionine
SAMS	<i>S</i> -adénosylméthionine synthétase
SHMT	sérine hydroxyméthyltransférase
SMC	<i>S</i> -méthylcystéine
SMM	<i>S</i> -méthylméthionine
THF	tétrahydrofolate
ThrS	thréonine synthase
TS	thymidylate synthase
$\alpha$ -CB	$\alpha$ -cétobutyrate

---

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>7</b>
A- STRUCTURE ET NOMENCLATURE DES FOLATES.....	7
B- BIOSYNTHESE ET CATABOLISME DES FOLATES. ....	9
I- Biosynthèse du tétrahydrofolate. ....	10
1- Synthèse et assemblage des précurseurs. ....	10
a- Synthèse du précurseur ptérine. ....	10
b- Synthèse du précurseur <i>p</i> -ABA.....	10
c- Assemblage des précurseurs.....	11
2- Réduction et polyglutamylation.....	11
II- Principales molécules antifolates. ....	13
1- Le méthotrexate. ....	14
2- Le triméthoprim. ....	14
3- Les sulfamides. ....	14
III- Catabolisme et recyclage des folates. ....	15
1- Recyclage du <i>p</i> -ABA-Glu.....	15
2- Recyclage du noyau ptérine.....	15
IV- Origines des unités monocarbonées.....	17
1- La glycine et la sérine .....	17
a- Incorporation d'unités C1 à partir de la sérine. ....	17
b- Incorporation d'unités C1 à partir de la glycine.....	18
2- Le formate. ....	19
V- Interconversion des dérivés monocarbonés. ....	19
VI- Trafic intracellulaire des folates. ....	21
C- LE METABOLISME MONOCARBONE. ....	22
I- Synthèse du pantothénate. ....	23
II- Synthèse des nucléotides et du formylméthionyl-ARNt. ....	24
1- Synthèse de l'AMP et du GMP.....	24
2- Synthèse du thymidylate.....	25
3- Synthèse du formylméthionyl-ARNt. ....	25
III- La photorespiration. ....	25
IV- Synthèse de la méthionine et cycle des méthyles. ....	26
1- La synthèse <i>de novo</i> de méthionine. ....	27
a- La cystathionine $\gamma$ -synthase. ....	27
b- La cystathionine $\beta$ -lyase. ....	28



c- La méthionine synthase chloroplastique. ....	28
2- Le cycle des méthyles. ....	28
a- La S- adénosylméthionine synthétase. ....	28
b- Les réactions de méthylations. ....	28
c- La S- adénosylhomocystéine hydrolase. ....	30
d- Les méthionine synthases cytosoliques. ....	30
3- Le cycle de la SMM. ....	30
4- Régulation de la synthèse de méthionine. ....	31
a- Compétition entre cystathionine $\gamma$ -synthase et thréonine synthase. ....	31
b- Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la CGS. ....	32
5- Catabolisme de la méthionine. ....	33
D- REGULATION DU METABOLISME C1 CHEZ LES PLANTES. ....	35
I- Distribution du folate au cours du développement. ....	35
II- Perturbation du métabolisme C1 chez les plantes. ....	36
III - Objectifs de mon travail de thèse. ....	37
<b>RESULTATS</b> .....	<b>39</b>
<b>CHAPITRE I : ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE ET METABOLIQUE DE LA REPONSE D'ARABIDOPSIS THALIANA A UNE CARENCE EN FOLATE INDUITE PAR LE METHOTREXATE</b> .....	<b>39</b>
<b>CHAPITRE II : METABOLISME MONOCARBONE ET SYNTHÈSE DE CHLOROPHYLLE : L'ACTIVITÉ MG-PROTOPORPHYRINE IX METHYLTRANSFERASE DEPEND DU STATUT EN FOLATES</b> .....	<b>65</b>
<b>CHAPITRE III : REGULATION DE LA SYNTHÈSE DE METHIONINE CHEZ ARABIDOPSIS : LE DOMAINE REGULATEUR N-TERMINAL DE LA CYSTATHIONINE <math>\gamma</math>-SYNTHASE EST CLIVÉ EN RÉPONSE A UNE CARENCE EN FOLATES</b> .....	<b>77</b>
<b>CHAPITRE IV : CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE D'UN GÈNE POTENTIELLEMENT IMPLIQUÉ DANS LA REGULATION DU METABOLISME MONOCARBONE</b> .....	<b>97</b>
A- INTRODUCTION .....	97
I- Le gène <i>MIG1</i> (MTX-Induced Gene 1) .....	97
II- La superfamille des $\alpha/\beta$ hydrolases. ....	98
III- La famille des sérine-hydrolases. ....	100

IV- Objectifs de l'étude.....	102
<b>B- ETUDES <i>IN VITRO</i> DES PROTEINES MIG1 ET DFR1.....</b>	<b>104</b>
I- Surproduction et purification de la protéine DFR1 de <i>S. pombe</i> .....	104
II- Mesure de l'activité dihydrofolate réductase de la protéine DFR1 de <i>S. pombe</i> .....	105
III- Surproduction et purification de la protéine MIG1.....	106
<b>C- ETUDES <i>IN PLANTA</i> DE LA PROTEINE MIG1.....</b>	<b>107</b>
I- Localisation subcellulaire de la protéine MIG1.....	107
II- Génotypage par PCR de mutants KO <i>mig1</i> .....	108
III- Conception et sélection de lignées <i>MIG1::GUS</i> .....	109
IV- Conception et sélection de lignées surexprimant <i>MIG1</i> .....	109
V- Le gène <i>MILI</i> (MTX-Induced gene Like 1). ....	109
<b>D- CONCLUSION.....</b>	<b>110</b>
<b>E- MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>112</b>
I- Matériel végétal.....	112
1- Culture de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	112
2- Culture de cellules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	112
II- Surproduction et purification de protéines recombinantes en système bactérien.....	112
1- Clonage des ADNc codant les protéines d'intérêt dans le vecteur pET20b(+). ....	112
a- MIG1.....	112
b- DFR1.....	112
2- Surproduction des protéines recombinantes en système bactérien. ....	113
a- Expression de DFR1-6His.....	113
b- Expression de MIG1-6His.....	113
3- Purification sur résine Ni-NTA des différentes protéines recombinantes.....	113
III- Techniques d'analyse des protéines.....	113
1- Dosage des protéines.....	113
2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE.....	113
IV- Mesure de l'activité dihydrofolate réductase de la protéine DFR1 de <i>S. pombe</i> .....	114
V- Localisation subcellulaire de la protéine de fusion MIG1-GFP par expression transitoire dans des protoplastes d' <i>Arabidopsis</i> .....	114
1- Clonage de l'ADNc codant MIG1 dans le vecteur pTH2.....	114
2- Préparation et transformation de protoplastes d' <i>Arabidopsis</i> .....	115
VI- Génotypage des mutants d'insertion d' <i>Arabidopsis</i> .....	115
1- Extraction d'ADN génomique.....	115
2- Génotypage par PCR.....	115
VII- Conception de lignées transgéniques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	116

1- Lignées surexprimant le gène <i>MIG1</i> .....	116
2- Lignées exprimant une fusion transcriptionnelle et traductionnelle <i>MIG1::GUS</i> . ....	117
3- Transformation de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	118
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>119</b>
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	125
PUBLICATIONS ET CONGRES.....	139

# **INTRODUCTION**

---



## INTRODUCTION

Le terme folate(s), ou plus couramment vitamine B9, désigne l'ensemble des molécules dont la structure de base est constituée par l'acide ptéroylglutamique (ou acide folique) (Angier et al, 1946). Dès leur découverte dans les années 1930, ces molécules suscitent un grand intérêt de la part de la communauté scientifique. En effet, les réactions dans lesquelles intervient la vitamine B9, regroupées sous le terme de métabolisme monocarboné (C1), sont essentielles au fonctionnement cellulaire puisqu'elles interviennent notamment lors de la synthèse des nucléotides mais aussi lors de la synthèse de la méthionine et de la S-adénosylméthionine. Cette dernière molécule constitue le donneur universel de groupements méthyles et alimente de la sorte toutes les réactions de méthylation qui ont lieu dans la cellule et qui sont nécessaires au métabolisme et au développement de l'organisme.

Les végétaux et la plupart des microorganismes ont la capacité de réaliser la synthèse *de novo* de la vitamine B9. Les animaux ne possédant pas la totalité des enzymes nécessaires à cette synthèse, ils dépendent de leur alimentation pour subvenir à leurs besoins en folates. Cette différence présente un intérêt majeur puisqu'elle permet de développer des molécules utilisées pour bloquer la synthèse *de novo* du folate chez les organismes autotrophes sans pour autant perturber le métabolisme de cette vitamine chez les auxotrophes et donc chez les animaux. C'est sur ce principe que repose la conception de nombreux antibiotiques, herbicides et antiparasitaires. Nous développerons cet aspect du métabolisme du folate plus tard dans ce manuscrit.

Cette auxotrophie vis-à-vis du folate peut, notamment chez l'Homme, aboutir à l'apparition de carence. Les insuffisances en folates peuvent également avoir pour origine une anomalie génétique touchant un gène impliqué dans l'absorption ou bien dans le métabolisme de ce cofacteur. Quelqu'en soient les causes, les déficiences en folate sont à l'origine de graves maladies.

Une des premières manifestations cliniques d'une carence en folates est l'apparition d'une anémie dite mégaloblastique. La vitamine B9 participant à la synthèse des nucléotides, une carence en folates entraîne un défaut de la synthèse d'acides nucléiques, ce qui a pour conséquence de bloquer le cycle cellulaire et donc la mitose. Ce phénomène touche particulièrement les tissus présentant une forte division cellulaire et principalement les érythrocytes. La production d'ARN et la synthèse des protéines n'étant cependant que peu affectées, les globules rouges sont moins nombreux mais présentent une taille supérieure à la normale, d'où le qualificatif "mégaloblastique" (Aslinia et al, 2006).

La perturbation de la division cellulaire peut également se traduire chez la femme enceinte par une anomalie de fermeture du tube neural (AFTN) du fœtus au cours de l'embryogenèse. Les AFTN correspondent à un défaut de fermeture, avant la 4<sup>ème</sup> semaine de grossesse, de la partie postérieure des vertèbres entourant le système nerveux central entraînant de graves malformations parmi lesquelles spina bifida, anencéphalie et encéphalocèle. La surveillance des anomalies congénitales en Europe, pour la période 1980-1999, montre que l'incidence des AFTN est de 10,9 / 10 000 naissances, la spina bifida étant la plus répandue (5,4 / 10 000 naissances) (A EUROCAT working Group. Report 8: surveillance of congenital anomalies in Europe 1980-1999: University of Ulster, Ireland, 2002). En 1976, R.W Smithells a mis en évidence une carence en nutriments, et particulièrement en folates, chez plusieurs femmes venant de donner naissance à des enfants atteints d'AFTN. Depuis, différentes études épidémiologiques ont démontré qu'une supplémentation de l'alimentation maternelle en acide folique lors de la période périconceptionnelle (4 semaines avant conception et 8 semaines après) réduit de 40 à 75% le risque d'une première manifestation d'AFTN mais également le risque de récurrence. Il

semblerait que certains facteurs génétiques participent également à l'apparition d'AFTN (Blom et al, 2006). En effet différentes équipes de chercheurs ont pu relier l'incidence des AFTN et la présence de mutations sur certains gènes codants pour des enzymes du métabolisme du folate (Johnson et al, 2004 ; Kirke et al, 2004). Les mécanismes par lesquels le folate contribue à prévenir les AFTN restent encore inconnus.

Depuis plusieurs années, de nombreuses études mettent en relation le statut en folate et l'apparition de nombreux types de cancers (col de l'utérus, colorectal, poumon, œsophage, cerveau, pancréas, sein ...). Les études les plus complètes à ce sujet concernent néanmoins l'incidence des cancers colorectaux en fonction de l'apport en folates (Choi et Mason, 2002). Il a ainsi été démontré que plusieurs aspects du métabolisme monocarboné sont impliqués dans l'aggravation des risques de développer un cancer (Hubner et Houlston, 2009). Le rôle que joue le folate dans la synthèse des nucléotides en est un. En effet, certains dérivés du folate participent à la synthèse de thymidine. Un déficit de ce nucléotide en cas de carence en folate induit une incorporation erronée d'uracile lors de la synthèse d'ADN. Les mécanismes de réparation de l'ADN n'étant pas totalement fiables, une carence en folates augmente la fréquence des mutations de l'ADN et aggrave donc le risque d'apparition de cancers (McKinnon et Caldecott, 2007). Une carence en folates induit également une diminution de la synthèse de méthionine et donc de *S*-adénylméthionine, ce qui a pour conséquence de diminuer la disponibilité en groupements méthyles dans la cellule. Or, les perturbations des méthylations de l'ADN sont également des facteurs aggravant les risques de cancers. En effet, la méthylation de résidus cytosines au niveau des îlots CpG de l'ADN est un important mode de régulation épigénétique de l'expression des gènes et facteur de stabilisation de la molécule d'ADN. Une réduction globale des méthylations de l'ADN se traduit par une instabilité chromosomique et par une augmentation des évènements de mutations (Eden et al, 2003).

Une carence en folates provoque également une accumulation du précurseur de la méthionine : l'homocystéine. Cette hyperhomocystéinémie est à l'origine de nombreuses maladies. Plusieurs mécanismes pathologiques de l'hyperhomocystéinémie ont été proposés, notamment une oxydation de l'endothélium (Cengel et al, 2006). Ce stress oxydant favorise également la peroxydation de lipides ce qui se traduit par une réponse inflammatoire, accélérant le phénomène d'athérosclérose. Sont également mis en cause : une induction de l'activation et de l'agrégation des plaquettes, une altération de l'équilibre entre agents procoagulants et anticoagulants, une diminution des méthylations ainsi qu'une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, tous ces désordres ayant pour conséquence une augmentation des risques cardiovasculaires (infarctus du myocarde, embolie pulmonaire...) (Trabetti, 2008 ; Lin et al, 2009). A titre indicatif, la classification de Kang et al (1992) définit trois niveaux d'hyperhomocystéinémie : modérée (15 à 30  $\mu\text{mol/l}$  de plasma), de grade intermédiaire (30 à 100  $\mu\text{mol/l}$ ) et sévère ( $>100$   $\mu\text{mol/l}$ ). Or, les études précédemment citées montrent une augmentation des risques d'accidents cardiovasculaires dès le premier niveau d'hyperhomocystéinémie.

Plus récemment, des rapports relient déficience en folate, hyperhomocystéinémie et maladies neurodégénératives, notamment les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Mattson, 2003). Une carence en folate entraîne une diminution de la synthèse de *S*-adénylméthionine et donc une réduction de la concentration de cette molécule dans le fluide cérébrospinal ainsi qu'une hyperhomocystéinémie. Cet appauvrissement a pour conséquence de diminuer les réactions de méthylation, provoquant de la sorte une baisse de la synthèse de myéline, substance qui gaine et protège les nerfs. De plus, il a été observé que des individus atteints de la maladie d'Alzheimer ou de la maladie de Parkinson présentaient les mêmes lésions du système vasculaire cérébral que

chez des rats ayant développé une hyperhomocystéinémie suite à un régime pauvre en folates (Tchantchou et Shea, 2008).

De nos jours, la déficience en folate est une des carences vitaminiques les plus fréquentes dans le monde et pose un problème de santé publique aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés. Un rapport du département de la santé américain considère que 70% de la population des pays industrialisés reçoit moins de 50% des apports journaliers recommandés (Services USDoHH, 1999). Aux Etats-Unis, 15% de la population présente des signes de carence en vitamine B9. En effet, les apports journaliers en folates recommandés par l'Académie Nationale des Sciences américaine sont de 400  $\mu\text{g}$  / jour pour l'ensemble de la population (hormis les femmes enceintes et allaitantes pour lesquelles les recommandations sont respectivement de 600  $\mu\text{g}$  / jour et 500  $\mu\text{g}$ / jour). Or, une étude menée en 1994 par le CDC (Centers for Disease Control and prevention) estimait à 275  $\mu\text{g}$  l'apport moyen journalier d'une personne vivant aux Etats-Unis (Alaimo et al, 1994). Concernant la France, un rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, 2003) estime en moyenne à 250  $\mu\text{g}$  par jour pour les femmes et 300  $\mu\text{g}$  / jour pour les hommes l'apport quotidien en folates par l'alimentation des français de plus de 15 ans. Les apports journaliers recommandés par l'AFSSA sont pourtant de 330  $\mu\text{g}$  / jour pour un homme adulte (300  $\mu\text{g}$ / j pour une femme) (Tableau 1). Afin d'éviter d'éventuels AFTN, la même agence recommande aux femmes désirant procréer d'atteindre un apport journalier de 400  $\mu\text{g}$  un mois avant la conception puis de 1 mg lors des 3 premiers mois de grossesse (le développement du tube neural se produisant lors de la 4<sup>ème</sup> semaine après fécondation). En 2000, la Direction Générale de la Santé a même émis une recommandation à 5 mg / jour concernant les femmes ayant un antécédent obstétrical d'AFTN.

Compte tenu de la précocité de la période pendant laquelle la supplémentation est efficace et au vu du fait que plus de 50% des grossesses ne sont pas programmées, l'AFSSA, dans son rapport de 2003, reconnaît que la promotion de la supplémentation individuelle seule n'a qu'un faible impact sur l'incidence des AFTN. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, quelques pays imposent l'enrichissement systématique en vitamine B9 de certains produits alimentaires de consommation courante. Ainsi, les Etats-Unis et le Canada ont rendu obligatoire, depuis 1998, l'ajout de 140  $\mu\text{g}$  d'acide folique par 100 g de produits céréaliers (15  $\mu\text{g}$  / 100g pour le Canada). Une étude menée par Williams et al (2002), montre une diminution de 31 % de l'incidence de la spina bifida aux Etats-Unis suite aux mesures de supplémentation systématique. Les données concernant le Canada montrent également une baisse du nombre d'AFTN avec une diminution allant jusqu'à 78% du taux d'AFTN sur l'île de Terre-Neuve (Eichholzer et al, 2006). Outre l'impact sur le taux d'AFTN, la fortification systématique en acide folique présente d'autres avantages. En effet, bien qu'il soit difficile de mesurer l'impact de la fortification systématique sur l'occurrence des accidents cardiovasculaires ou des maladies neurodégénératives (ces pathologies présentant des origines multiples), certaines études statistiques tendent néanmoins à démontrer qu'après 1998, date de début de la supplémentation obligatoire, la mortalité due aux accidents cardiovasculaires a diminué aux Etats-Unis (moins 9,3% en 2009) parallèlement au taux de survenue de AFTN (Yang et al, 2009). De plus, dès 1999, une étude américaine constatait une diminution de la concentration moyenne en homocystéine (de 10,1 à 9,4  $\mu\text{mol}$  par litre de sang) après la mise en place de la fortification. De façon plus marquée, cette même équipe a constaté que le taux d'individus présentant une hyperhomocystéinémie ( $>15 \mu\text{mol}/\text{l}$ ) chutait de 18,7% à 9,8% (Jacques et al, 1999).

En 2008, 52 pays dans le monde avaient adopté cette politique de supplémentation systématique, principalement sur le continent américain. En Europe, seule la Hongrie pratique cette supplémentation. Dans chacun de ces pays, aucune augmentation statistiquement



significative d'effets indésirables de la supplémentation en folates n'a été observée (Bhutta et Hasan, 2002). Cependant, la plupart des pays de l'Union Européenne n'ont pas encore pris la décision d'instaurer cette supplémentation et ce pour différentes raisons. Ainsi, un risque potentiel de masquage d'un déficit en vitamine B12 a été mis en avant par certains scientifiques. En effet, une supplémentation en folate chez des individus présentant une carence en vitamine B12 (cobalamines) peut avoir comme effet de masquer les signes hématologiques communs aux deux types de carences (B9 et B12), empêchant de la sorte un diagnostic rapide de la carence en vitamine B12. Egalement, si un apport en folate adéquat semble être un facteur de protection contre l'apparition de cancers, certaines équipes de recherche craignent qu'une supplémentation en folates n'accélère le développement des tumeurs cancéreuses lorsque celles-ci sont déjà établies (Eichholzer et al, 2006).

Une supplémentation en folates, telle qu'effectuée aux Etats-Unis, semble plus difficile à mettre en place notamment dans les pays en voie de développement. Les végétaux représentant la source alimentaire principale de folates (Tableau 2), une stratégie alternative à cette supplémentation consisterait à obtenir ou à sélectionner des plantes capables d'accumuler ces composés. Ainsi, différentes études pilotes ont consisté à manipuler, chez différentes espèces végétales, la voie de synthèse du folate afin d'accroître leur teneur en vitamine B9. Ces essais d'ingénierie métabolique ont été menés notamment chez le riz et la tomate, deux espèces végétales dont on consomme les graines ou les fruits qui sont pauvres en folates (Storozhenko et al, 2007a ; Diaz de la Garza et al, 2007). Les céréales et notamment le riz, constituent l'alimentation de base de millions de personnes à travers le monde. La tomate est, elle, un des fruits les plus consommés dans les pays industrialisés et présente l'avantage d'être souvent consommée crue, ce qui permet d'éviter la dégradation de la vitamine B9 lors de la cuisson. La manipulation génétique de la tomate a permis d'augmenter sa teneur en folates dans le fruit mûr de plus de 25 fois et jusqu'à 100 fois chez le riz (Diaz de la Garza et al, 2007, Storozhenko et al, 2007a). Un problème se pose cependant puisqu'en parallèle de cette augmentation, les chercheurs ont constaté une forte accumulation des précurseurs de la voie de biosynthèse du folates chez la tomate génétiquement modifiée (Diaz de la Garza et al, 2007). Or, aucune étude à ce jour ne permet de garantir l'innocuité de l'enrichissement de l'alimentation humaine en précurseurs du folate.

Les solutions envisagées pour accroître la teneur en folates des végétaux nécessitent tout d'abord de bien connaître la voie de biosynthèse de la vitamine B9, mais également la façon dont cette voie est régulée en fonction des besoins de la plante. De plus, l'état de nos connaissances concernant la régulation du métabolisme monocarboné lors d'une perturbation de l'homéostasie du folate ne nous permet pas d'évaluer les conséquences à moyen et long terme sur les plantes génétiquement modifiées. Par exemple, une étude a montré que des plants mutés pour le gène de la 5-formyl-tétrahydrofolate cycloligase accumulent environ 2 fois plus de folate mais présentent un retard de croissance (Goyer et al, 2005).

Lors de ma thèse, je me suis intéressée à la régulation du métabolisme du folate chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Plus particulièrement, j'ai mis en évidence certains mécanismes qui se mettent en place pour répondre de façon précoce, dans un premier temps, puis à plus long terme, à une altération de la quantité intracellulaire de folates.

<b>Apports journaliers recommandés</b>	par l'AFSSA	par l'Académie des Sciences américaine
Homme adulte	330	400
Femme adulte	300	400
Femme enceinte	1000	600
Femme allaitante	400	500
<b>Apports quotidiens en folates par l'alimentation</b>	estimations INCA	estimations CDC
Homme adulte	300	320
Femme adulte	250	230

**Tableau 1: Récapitulatif des apports journaliers en folates recommandés par l'AFSSA ou par l'Académie des Sciences américaine.** Les apports quotidiens en folates par l'alimentation en France et aux Etats-Unis sont également indiqués. Pour la France, il s'agit d'estimations réalisées lors de l'enquête INCA (Enquête Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires). Les estimations pour les Etats-Unis ont été réalisées par le CDC (Centers for Disease Control and prevention).

#### **Teneur en folates ( $\mu\text{g}$ pour 100g)**

Germe de blé	1800
Foie de bœuf	260
Epinards	190
Lentilles	180
Laitue	140
Pousses de soja	111
Brocolis	107
Pain	100
Riz	97
Avocat	88
Petits pois	65
Camembert	60
Œuf	46
Banane	20
Tomate	14
Pomme de terre	10
Bœuf	10
Saumon	5
Pomme	3

**Tableau 2 : Teneur en folates de quelques aliments.**  
D'après l'"USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21".



# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**



## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

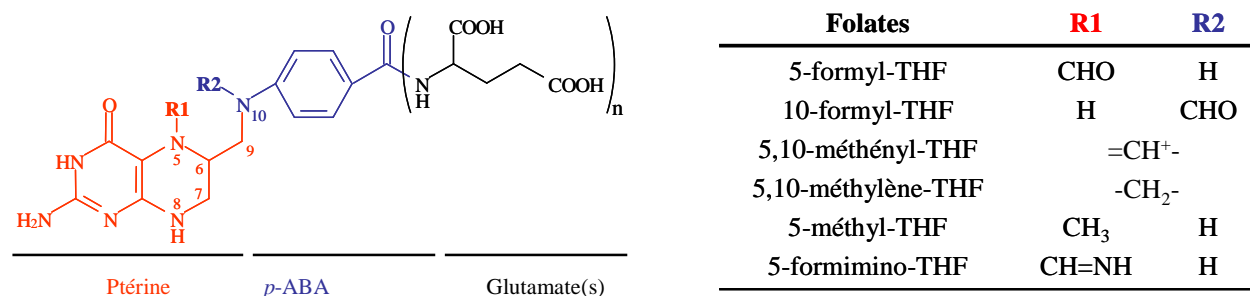
### A- STRUCTURE ET NOMENCLATURE DES FOLATES.

Le terme folate(s) désigne un ensemble de molécules qui ont toutes pour structure de base l'acide folique (ou acide ptéroylglutamique). Il s'agit d'une molécule tripartite composée d'un noyau ptérine lié à un acide *para*-aminobenzoïque (*p*-ABA) sur lequel s'articule une chaîne (poly)glutamate dont le nombre de résidus varie de 1 à 14 (Figure 1) (Rébeillé et al, 2006).

Cette structure de base est partagée par de nombreuses molécules qui vont se différencier par le niveau d'oxydation du noyau ptérine, par la nature de l'unité monocarbonée liée à la partie ptérine et/ou à la partie *p*-ABA mais également par le nombre de résidus constituant la queue polyglutamate.

Au niveau cellulaire, ce pool de folates n'est composé que de dérivés du dihydrofolate (DHF) et du tétrahydrofolate (THF) qui sont des formes réduites de l'acide folique. En effet, ce dernier ne constitue pas un folate naturel mais correspond à une forme synthétique utilisée notamment dans les compléments alimentaires. Il arrive cependant que l'acide folique soit retrouvé sous forme de traces dans des dosages de folates cellulaires. Dans ce cas, il s'agit d'un artefact expérimental dû à la technique utilisée pour l'extraction des folates (oxydation chimique) (De Brouwer et al, 2007).

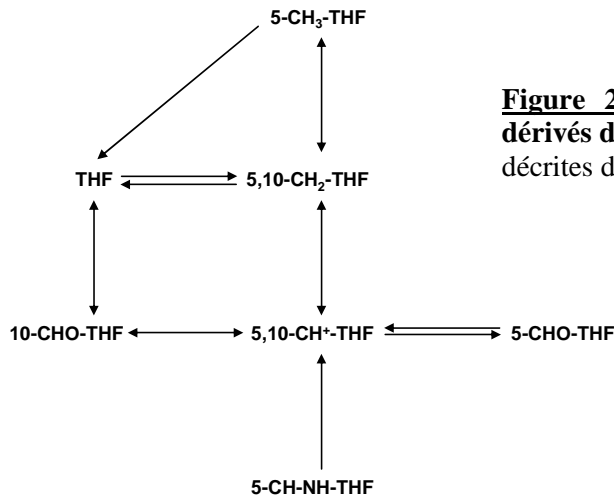
Le THF joue un rôle essentiel dans la cellule puisqu'il intervient en tant que cofacteur lors du métabolisme monocarboné. Ce métabolisme regroupe un grand nombre de réactions qui nécessitent le transfert d'unités monocarbonées (C1). Or, le THF est la seule forme de folate à posséder la capacité de lier et de céder des unités C1.



**Figure 1:** Structure des différents dérivés du tétrahydrofolate.

R1 et R2 marquent les atomes permettant la liaison des unités C1 au tétrahydrofolate.

Les unités C1 chargées sur le THF varient par leur état d'oxydoréduction. Ainsi le THF peut transporter des groupements méthyle, méthylène, et sous des formes plus oxydées, méthényle, formyle, formimino. Ces unités sont liées de façon covalente au THF via les atomes d'azote N<sub>5</sub> du noyau ptérine et / ou N<sub>10</sub> du *p*-ABA (Figure 1). Les formes chargées de THF sont toutes interconvertibles à l'exception du 5-formimino-THF (Figure 2).



**Figure 2: Interconversions enzymatiques des différents dérivés du THF.** Les enzymes réalisant ces conversions seront décrites dans la suite de ce manuscrit.

Si la queue polyglutamate ne joue pas de rôle dans la liaison aux unités C1, elle possède tout de même une fonction importante puisque du nombre de résidus glutamate (de 1 à 14) va dépendre le transport intra et intercellulaire des folates, leur stabilité et leur utilisation. En effet, la chaîne polyglutamate peut avoir un rôle dans la rétention des folates à l'intérieur de la cellule ou des différents organites. Dans les cellules animales, la forme monoglutamate est la forme préférentielle de transport à travers les membranes, la perméabilité pour les dérivés polyglutamates étant beaucoup plus faible (McGuire et Bertino, 1981). De même, chez *Arabidopsis*, la présence de l'enzyme responsable de l'allongement de la queue polyglutamate (la folylpolyglutamate synthétase) dans le cytosol, le plaste et la mitochondrie suggère un intense trafic du THF sous sa forme monoglutamate (Ravanel et al, 2001).

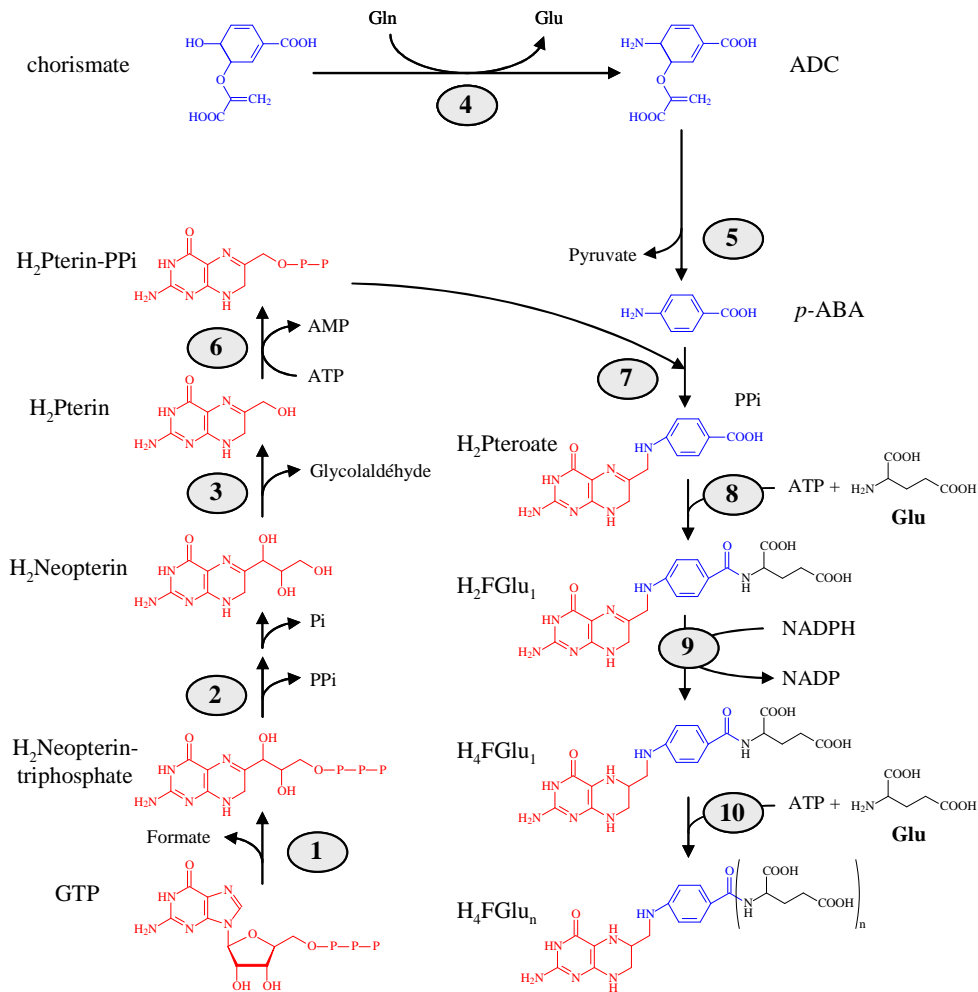
Les propriétés cinétiques des enzymes folate-dépendantes sont également fortement influencées par la longueur de la chaîne polyglutamate. Une étude menée *in vitro* sur plusieurs enzymes folate-dépendantes a montré que celles-ci présentent une plus grande affinité pour les formes polyglutamates que pour les formes monoglutamates (McGuire et Bertino, 1981), ce que d'autres études réalisées cette fois *in vivo* sur des cellules animales ont, par la suite, confirmé (Strong et al, 1990). De plus, dans les mitochondries de plantes, l'affinité de la protéine T du complexe de la glycine décarboxylase et de la sérine hydroxyméthyltransférase pour le THF augmente fortement avec le nombre de résidus glutamate, les  $K_m$  les plus faibles étant obtenus avec 4 et 5 résidus glutamate. Or, il est intéressant de noter que les dérivés du THF dans ce même compartiment sont présents principalement sous les formes tétra- et pentaglutamylées (Besson et al, 1993). Les méthionine synthases, elles, utilisent exclusivement des dérivés polyglutamylés du  $\text{CH}_3\text{-THF}$  pour réaliser la synthèse de méthionine (Ravanel et al, 2004).

La présence de la chaîne polyglutamate permet également d'augmenter la stabilité des folates. En effet, la plus grande affinité que présentent les enzymes à folates vis-à-vis des formes polyglutamylées permet de protéger la molécule contre les dégradations oxydatives. Le folate est une molécule très fragile et facilement oxydable. Or, lorsque le THF est lié aux enzymes folate-dépendantes, sa durée de vie se trouve considérablement allongée (Rébeillé et al, 1994).

## B- BIOSYNTHESE ET CATABOLISME DES FOLATES.

Les plantes, les champignons, les levures, la plupart des bactéries ainsi que les parasites apicomplexes comme *Plasmodium falciparum* possèdent la capacité de réaliser la synthèse *de novo* du THF (Rébeillé et al, 2006). Les animaux, et par conséquent l'Homme, ne sont pas en mesure de réaliser cette synthèse puisqu'ils ne possèdent pas la totalité des enzymes nécessaires.

La voie de biosynthèse *de novo* du THF est désormais entièrement connue chez les plantes (Figure 3), elle comprend dix étapes qui sont les mêmes que chez la bactérie (Rébeillé et al, 2006). Dans ce chapitre, nous nous bornerons à l'exposé de la voie de biosynthèse du THF chez les plantes.



**Figure 3: Représentation schématique de la voie de biosynthèse du tétrahydrofolate chez les plantes.**

1: GTP cyclohydrolase I; 2: dihydronéoptérinetriphosphate pyrophosphatase; 3: dihydronéoptérine aldolase; 4: aminodéoxychorismate (ADC) synthase; 5: ADC lyase; 6: hydroxyméthyl-dihydroptérine pyrophosphokinase; 7: dihydroptéroate synthase; 8: dihydrofolate synthétase; 9: dihydrofolate réductase; 10: folylpolyglutamate synthétase. H<sub>2</sub> et H<sub>4</sub> : formes dihydro- et tétrahydro- des ptérides ou des folates.



## I- Biosynthèse du tétrahydrofolate.

La voie de biosynthèse du THF chez les plantes présente plusieurs particularités. En effet, certaines enzymes de cette voie possèdent une structure primaire tout à fait originale. De plus, les différents précurseurs du THF ne sont pas synthétisés dans le même compartiment cellulaire : la partie ptérine est synthétisée dans le cytosol, le *p*-ABA dans le plaste et la combinaison de ces deux éléments, ainsi que l'ajout du premier résidu glutamate, sont réalisés dans la mitochondrie.

### 1- Synthèse et assemblage des précurseurs.

#### a- Synthèse du précurseur ptérine.

Le noyau ptérine du THF est synthétisé dans le cytosol à partir de GTP (étapes 1 à 3, Figure 3). La GTP cyclohydrolase I (GCHI) cyclise le GTP pour former la dihydronéoptérine triphosphate (étape 1, Figure 3). La GCHI est présente chez tous les organismes capables de synthétiser le THF *de novo* mais également chez les mammifères chez qui elle est impliquée dans la synthèse de tétrahydrobioptérine (Werner-Felmayer et al, 2002). Cette molécule joue un rôle important puisqu'elle sert de cofacteur lors de la synthèse d'oxyde nitrique et qu'elle participe à la conversion de la phénylalanine en tyrosine. L'absence de peptide d'adressage sur la séquence prédite de la GCHI de plante indique que cette enzyme est cytosolique (Basset et al, 2002). La structure primaire de la GCHI de plante présente une caractéristique inédite par rapport à l'enzyme bactérienne ou animale. En effet, les séquences prédites pour la GCHI d'*Arabidopsis*, de *Medicago truncatula* et de tomate montrent que l'enzyme possède 2 domaines GCHI. Aucun des 2 modules ne possède une séquence GCHI complète, ainsi ils doivent être rassemblés sur un même polypeptide pour être actifs.

La réaction suivante de la synthèse du noyau ptérine consiste à éliminer la chaîne phosphate de la dihydronéoptérine triphosphate (étape 2, Figure 3). Cette étape est réalisée en deux temps : une dihydronéoptérinetriphosphate pyrophosphatase permet la formation de dihydronéoptérine monophosphate avec relargage d'un pyrophosphate. Ensuite, une phosphatase non spécifique clive le dernier phosphate pour produire une molécule de dihydronéoptérine (Klaus et al, 2005a).

L'étape suivante de cette voie de biosynthèse consiste à cliver la chaîne latérale de la dihydronéoptérine. Cette réaction est catalysée par la dihydronéoptérine aldolase (étape 3, Figure 3), ce qui permet la formation de 6-hydroxyméthyl-dihydroptérine tout en libérant du glycolaldéhyde. Selon une étude de 2004 (Goyer et al, 2004), il existe 3 dihydronéoptérine aldolases chez *Arabidopsis*, toutes cytosoliques compte tenu de l'absence de séquence d'adressage prédite. Deux gènes codant pour ces enzymes présentent une expression constante au niveau de la plante entière alors que le troisième ne semble s'exprimer que très faiblement et uniquement dans les siliques (Goyer et al, 2004).

#### b- Synthèse du précurseur *p*-ABA.

Il y a encore peu de temps, le consensus général était que le *p*-ABA existait principalement dans la cellule végétale sous sa forme libre. Il semble pourtant que la forme prédominante soit en fait un conjugué *p*-ABA-glucose. Cependant, ce conjugué ne participe pas à la synthèse du THF mais constitue probablement une forme de stockage du *p*-ABA à l'intérieur de la vacuole et permet de cette façon de maintenir une certaine homéostasie de ce métabolite à l'intérieur de la cellule (Eudes et al, 2008). Une activité de transfert de glucose sur le *p*-ABA à partir d'UDP-glucose a effectivement été mesurée dans le cytosol ainsi qu'une activité glucose estérase (Quinlivan et al, 2003).

La synthèse du *p*-ABA se déroule dans le chloroplaste en deux étapes à partir du chorismate: dans un premier temps, l'aminodésoxychorismate (ADC) synthase catalyse la formation d'ADC et de glutamate à partir de chorismate et de glutamine (étape 4, Figure 3). L'ADC synthase réalise en fait 2 réactions, la première étant la conversion d'une molécule de glutamine en glutamate, ce qui permet la formation d'une molécule d'ammoniac; l'autre consistant à transférer cet ammoniac sur le chorismate. Chez *E.coli*, cette activité ADC synthase est portée par 2 enzymes distinctes (*pabA* et *pabB*) alors que chez la plante ces deux domaines fonctionnels sont rassemblés sur un même polypeptide (Basset et al, 2004a). La deuxième étape de cette synthèse consiste en un clivage de l'ADC pour donner du *p*-ABA ainsi que du pyruvate (étape 5, Figure 3). Cette réaction est catalysée par l'ADC lyase, qui présente une localisation chloroplastique (Basset et al, 2004b).

### c- Assemblage des précurseurs.

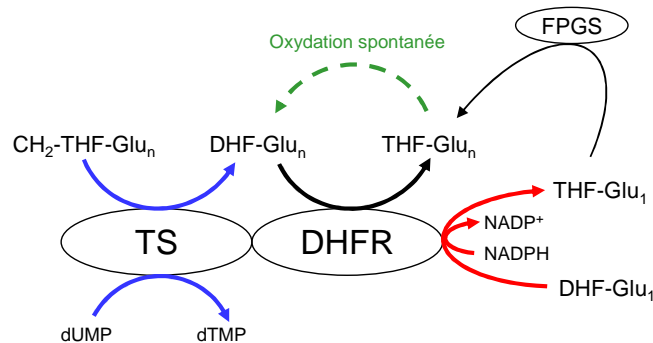
L'assemblage des précurseurs ptérine et *p*-ABA a lieu dans la mitochondrie et conduit à la formation de dihydroptéroate. Cette réaction nécessite d'activer l'hydroxyméthylidihydroptérine en la phosphorylant. Cette opération est réalisée par l'hydroxyméthylidihydroptérine pyrophosphokinase (HPPK) (étape 6, Figure 3). Dans un second temps, la condensation du noyau ptérine et du *p*-ABA est réalisée par la dihydroptéroate synthase (DHPS) (étape 7, Figure 3). Chez les plantes, ces deux réactions sont catalysées par une enzyme bifonctionnelle, l'HPPK-DHPS, alors que chez les bactéries ces activités sont portées par deux enzymes distinctes, *folK* et *folP* (Rébeillé et al, 1997). L'étape de condensation réalisée par le domaine DHPS de l'HPPK-DHPS de plante est sujette à un rétrocontrôle négatif par le dihydroptéroate (produit de la réaction), le DHF ainsi que par le THF, ce qui suggère que cette enzyme constituerait un point de contrôle de la partie mitochondriale de la voie de biosynthèse du THF (Mouillon et al, 2002). En outre, Storozhenko et al. (2007b) ont mis en évidence l'existence d'une isoforme cytosolique de l'HPPK-DHPS chez *Arabidopsis*. Les auteurs ont démontré que cette copie cytosolique était exclusivement exprimée dans les tissus reproducteurs (particulièrement dans les graines en développement) contrairement à la forme mitochondriale dont l'expression est constitutive. Les auteurs ont également constaté une accumulation de transcrits correspondant à la forme cytosolique lors d'un stress salin. Malgré ces données, le rôle joué par cette HPPK-DHPS n'est toujours pas clair à ce jour.

Le troisième temps de cette voie de synthèse mitochondriale correspond à la réaction ATP-dépendante d'attachement d'un résidu glutamate sur le groupement carboxyl du *p*-ABA pour former le DHF (étape 8, Figure 3). Cette réaction est catalysée par la dihydrofolate synthétase (Ravel et al, 2001), une enzyme essentielle au développement de la plante puisqu'une mutation du gène correspondant s'avère embryotoxique chez *Arabidopsis* (Ishikawa et al, 2003).

### 2- Réduction et polyglutamylation.

Le DHF est réduit en THF par la dihydrofolate réductase (DHFR) (étape 9, Figure 3). Cette réaction utilise le NADPH comme donneur d'électrons. Chez les plantes supérieures et les protozoaires, l'activité DHFR est portée par une enzyme bifonctionnelle où elle est associée à l'activité thymidylate synthase (TS) (Rébeillé et al, 2006). La partie TS catalyse la méthylation de déoxyuridine-monophosphate (dUMP) en déoxythymidine-monophosphate (thymidylate ou dTMP) en présence de CH<sub>2</sub>-THF-Glu<sub>n</sub>. La réaction catalysée par la TS est unique car le CH<sub>2</sub>-THF-Glu<sub>n</sub> agit à la fois comme donneur d'unité C1 et comme agent réducteur, produisant du DHF-Glu<sub>n</sub>. Ce dernier est alors réduit à nouveau en THF-Glu<sub>n</sub> par l'activité DHFR. Ainsi, le domaine DHFR de l'enzyme bifonctionnelle joue plusieurs rôles (Figure 4). Cette protéine est impliquée dans la réduction du DHF-Glu<sub>1</sub> provenant de la synthèse *de novo* du THF, dans la réduction du DHF-Glu<sub>n</sub> produit par l'oxydation spontanée du THF-Glu<sub>n</sub> et enfin dans la réduction du DHF-Glu<sub>n</sub> produit par l'activité TS. L'association DHFR et TS via un système de

"channeling" électrostatique facilite le recyclage du DHF-Glu<sub>n</sub> en évitant que ce dernier ne se disperse dans le milieu environnant (Liang et Anderson, 1998).



**Figure 4: Rôles de la DHFR-TS dans le contrôle de l'homéostasie en folates.**

La DHFR réduit le DHF-Glu<sub>1</sub> au cours de la biosynthèse *de novo* du THF-Glu<sub>1</sub> (■), mais également le DHF-Glu<sub>n</sub> produit lors de la synthèse du thymidylate (■) ou suite à l'oxydation spontanée du THF-Glu<sub>n</sub> (■).

Chez *Arabidopsis*, 3 isoformes de la DHFR-TS sont codées par le génome. Les trois séquences codant ces isoformes ne montrent pas de peptide d'adressage identifiable, posant le problème de leur localisation. Sur cet aspect, la littérature est un peu confuse, mais la compilation des données obtenues grâce à des études menées sur le pois (Neuburger et al, 1996) et la carotte (Luo et al, 1997) semblent indiquer que le plaste, la mitochondrie ainsi que le cytosol possèdent chacun une isoforme de la DHFR-TS.

A ce stade de la voie de biosynthèse du folate, le THF se trouve sous sa forme monoglutamylée. La dernière étape de la voie de biosynthèse du THF consiste à allonger la queue polyglutamylée. Celle-ci est formée par l'addition séquentielle de résidus glutamate liés entre eux par une liaison peptidique faisant intervenir le carboxyle  $\gamma$  du glutamate. Cette réaction est catalysée par la folylpolyglutamate synthétase (FPGS). Le rôle fondamental de cette étape dans la synthèse du THF a été montré notamment par la caractérisation de mutants de *S. cerevisiae* affectés dans l'activité FPGS et présentant une auxotrophie pour la méthionine car la méthionine synthase est strictement dépendante des formes polyglutamates du CH<sub>3</sub>-THF (DeSouza et al, 2000).

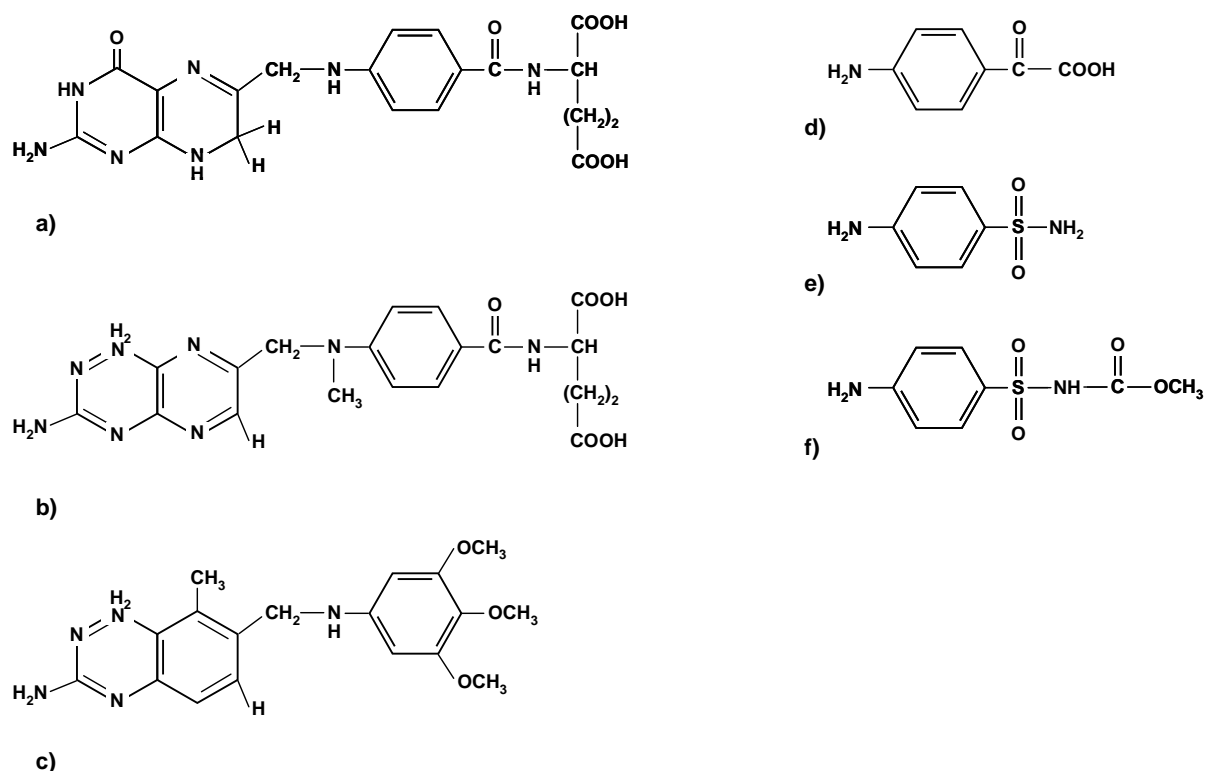
Dans les cellules de plante, le folate présent dans le cytosol est principalement sous la forme de 5-CH<sub>3</sub>-THF-Glu<sub>n</sub> (Cossins, 2000). Les mitochondries et les chloroplastes contiennent également principalement (>90%) des formes polyglutamylées du THF (Cossins et Chen, 1997). Il n'est donc pas surprenant que trois isoformes de FPGS localisées respectivement dans le cytosol, la mitochondrie et le chloroplaste soient observables chez *Arabidopsis* (Ravanel et al, 2001). Chez *A. thaliana*, chaque isoforme est codée par un gène différent, une situation unique chez les eucaryotes (Ravanel et al, 2001). En effet, chez les mammifères et les levures, les FPGS présentes dans la mitochondrie et le cytosol sont le produit de la transcription alternative d'un seul gène. Ce gène contient deux sites d'initiation de la transcription, l'ARNm le plus long codant pour la forme mitochondriale (Freemantle et al, 1995). Le caractère unique du système végétal suggère que l'expression de chaque isoforme de FPGS peut-être contrôlée de manière indépendante.

## II- Principales molécules antifolates.

Les inhibiteurs de la synthèse de folates (ou antifolates) sont couramment utilisés en médecine depuis une soixantaine d'années. En effet, de nombreux organismes pathogènes pour l'Homme sont autotrophes pour le folate, et certains antifolates sont employés avec succès pour leurs propriétés antibactérienne et antiparasitaire (notamment comme anti-paludéen) (Nzila, 2006).

Certains antifolates, comme le méthotrexate, ciblent cependant une enzyme également présente chez les mammifères, la DHFR. De telles molécules sont principalement employées dans le cadre de thérapies anticancéreuses. Lorsqu'un cancer est détecté, une des stratégies thérapeutiques consiste à traiter le patient à l'aide de molécules antifolates. Le principe de ce traitement repose sur le fait que les cellules cancéreuses se divisent plus rapidement que les cellules saines. Le folate participant à la synthèse des nucléotides, l'induction d'une carence en folates permet ainsi de bloquer la synthèse nucléotidique et donc la mitose. Ce déficit en acides nucléiques provoque également une incorporation erronée de bases azotées au sein de la molécule d'ADN. Les systèmes de réparation de l'ADN ne disposant plus des nucléotides nécessaires, des cassures sur les brins d'ADN apparaissent. La mort cellulaire intervient alors par nécrose ou apoptose (McGuire, 2003).

Selon leur nature, les antifolates peuvent donc être employés comme agents antibactériens, agents anti-paludéens, agents anti-cancéreux et même comme herbicides. Ils ont tous comme caractéristique commune de présenter une structure analogue à celle d'un folate naturel ou d'un de ses précurseurs.



**Figure 5 :** Structures a) du dihydrofolate, b) du méthotrexate, c) du triméthoprime, d) du *p*-ABA, e) du sulfanilamide et f) de l'asulam.

### 1- Le méthotrexate.

Cet antifolate est utilisé comme anticancéreux depuis les années 1950 et reste encore aujourd'hui le plus employé. Il permet de traiter notamment les leucémies, les ostéosarcomes, les cancers du sein. Il est également utilisé pour traiter l'arthrite et le psoriasis (McGuire, 2003).

Le méthotrexate (MTX), ou améthoptérine, a la capacité de pénétrer dans les cellules de mammifères *via* les systèmes de transport des folates naturels. Une fois à l'intérieur de la cellule, il peut être polyglutamylé par la FPGS. Le MTX ayant une structure analogue à celle du DHF (Figure 5), sa cible est la DHFR, ce qui lui confère un grand pouvoir comme antifolate puisqu'il bloque ainsi la synthèse *de novo* du THF mais également son recyclage (Figure 4, page 11). Le MTX agit comme antifolate non seulement chez les animaux mais également chez les plantes (Prabhu et al, 1998).

### 2- Le triméthoprim.

Le triméthoprim est également un inhibiteur de la DHFR mais, contrairement au MTX, ce composé ne pénètre pas à l'intérieur de la cellule en utilisant les systèmes de transport du folate. S'agissant d'un antifolate de nature lipophile (Figure 5), il passe la membrane plasmique par diffusion passive. Cette caractéristique fait du triméthoprim un antifolate utilisé contre les procaryotes qui ne possèdent pas les mêmes systèmes de transport du folate que les eucaryotes. Hitchings et Elion ont obtenu le prix Nobel de médecine en 1988 pour leur découverte des diaminopyrimidines, famille dont fait partie le triméthoprim. En effet, ce groupe de molécules affiche une grande spécificité pour la DHFR bactérienne en raison des différences structurales entre les enzymes procaryote et eucaryote (Quinlivan et al, 2000). Les diaminopyrimidines sont donc couramment employées comme antibiotiques (McGuire, 2003).

### 3- Les sulfamides.

Le sulfanilamide fait partie de la famille des sulfamides. Cette molécule antifolate est un antibiotique de choix puisqu'il inhibe la synthèse *de novo* du folate au niveau de la DHPS, enzyme que possèdent les plantes, les procaryotes, les champignons et les parasites. Le sulfanilamide présente une structure proche de celle du *p*-ABA (Figure 5) et entre donc en compétition avec celui-ci pour l'étape de conjugaison avec la partie ptérine (Figure 3, page 8). Contrairement au MTX et au triméthoprim, le sulfanilamide inhibe uniquement la synthèse *de novo* du THF mais ne perturbe pas son recyclage par la DHFR (Figure 4, page 11). Cette molécule aura donc une action antifolate moins marquée que le MTX et le triméthoprim.

L'asulam (vendu par Rhône-Poulenc sous le nom d'Azulox®) est également un analogue du *p*-ABA qui, comme le sulfanilamide, inhibe la DHPS. Néanmoins, cet antifolate n'est pas utilisé comme antibiotique mais comme herbicide.

### III- Catabolisme et recyclage des folates.

Le catabolisme du folate se traduit par une oxydation spontanée des différents dérivés du folate et particulièrement du DHF et du THF. Cette dégradation oxydative conduit au relargage de la partie *p*-ABA (sous une forme mono ou polyglutamylée) et du noyau ptérine sous la forme ptérine-aldéhyde (Suh et al, 2001).

Chez les mammifères, le *p*-ABA-Glu issu de la dégradation des folates subit une acétylation produisant ainsi de l'acétamidobenzoylglutamate qui est ensuite excrété dans les urines. La partie ptérine-aldéhyde est, dans un premier temps, stockée au niveau du foie, puis lentement évacuée *via* le système urinaire.

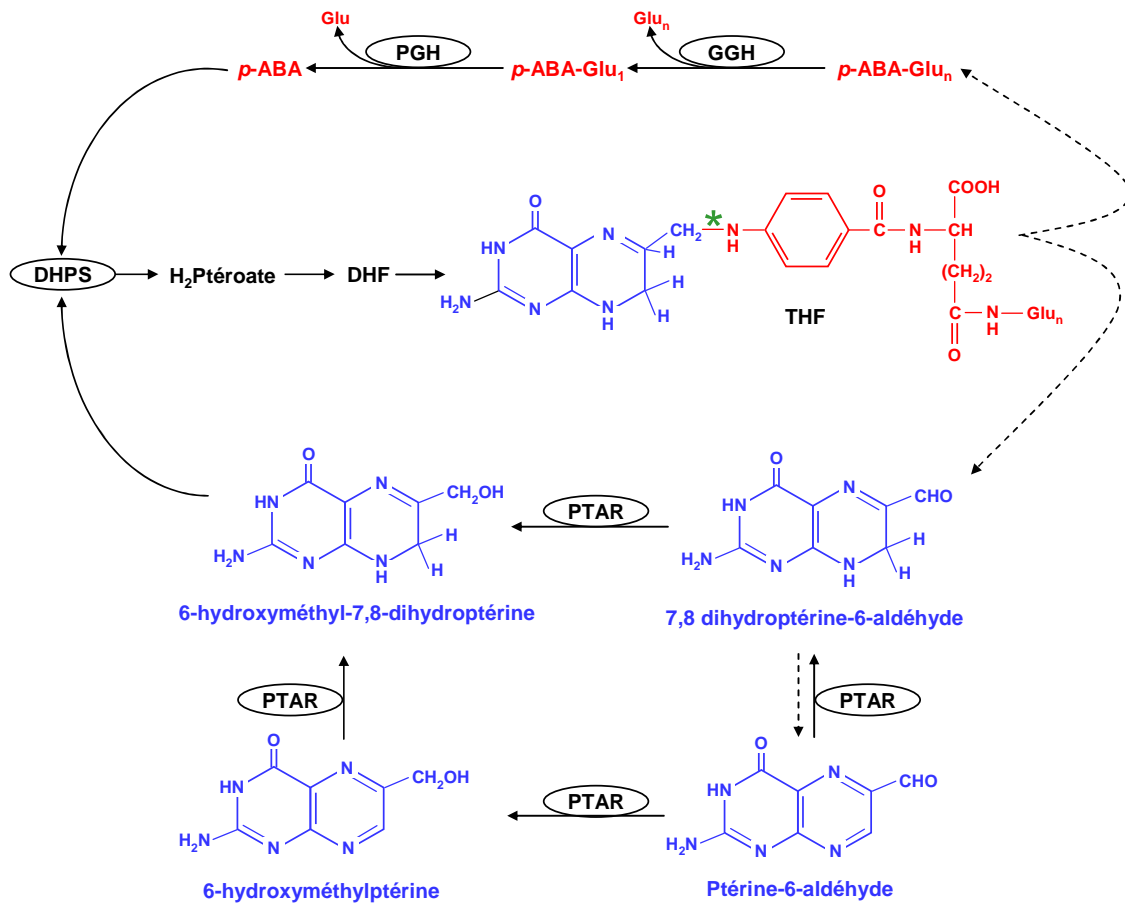
Lors de différentes études menées chez l'Homme, l'introduction d'acide folique radiomarqué dans un régime alimentaire contrôlé en folates a permis d'évaluer à environ 0,5 % par jour le taux de dégradation du folate (Gregory and Quinlivan, 2002). Chez les plantes, il semble que cette vitesse de dégradation soit beaucoup plus importante. En effet, en inhibant, par l'emploi de sulfanilamide, la synthèse *de novo* de folates sur des plantes cultivées en hydroponie Orsomando et al (2006) ont mesuré une diminution de la quantité totale de folates dans les feuilles de l'ordre de 10 % par jour. Mais contrairement aux mammifères, il semblerait que les plantes soient en mesure de recycler les produits de la dégradation du folate. Bien que cette voie de recyclage ne soit pas encore totalement élucidée, des études menées chez *Arabidopsis* et le pois, complétées par des données recueillies chez certains microorganismes, ont permis à l'équipe de Andrew Hanson de proposer un modèle de recyclage des produits de la dégradation du folate.

#### 1- Recyclage du *p*-ABA-Glu

Il a été démontré que les plantes ont la capacité de réinjecter la partie *p*-ABA-Glu dans la voie de synthèse du folate au niveau de la DHPS pour donner du DHF (Figure 6) (Bozzo et al, 2008). La DHPS étant incapable de manipuler les formes polyglutamylées de *p*-ABA, le recyclage du *p*-ABA-Glu<sub>n</sub> nécessite comme étape préalable l'hydrolyse de la queue polyglutamate grâce à des  $\gamma$ -glutamyl hydrolases (GGH) (Figure 6). Chez *Arabidopsis*, trois membres de cette famille ont été identifiés et l'activité  $\gamma$ -glutamyl hydrolase n'a été détectée qu'au niveau de la vacuole (Orsomando et al, 2005). Bien que la DHPS puisse utiliser la forme monoglutamylée du *p*-ABA, cette réaction reste très largement minoritaire *in vivo* (Orsomando et al, 2006). La deuxième étape de ce recyclage consiste donc à retirer le dernier résidu glutamate. Cette réaction est catalysée par une *para*-aminobenzoylglutamate hydrolase (PGH). Bien qu'aucun gène codant pour une telle protéine n'ait été identifié, des expériences de localisation subcellulaire pratiquées sur feuilles de pois ont détecté une activité PGH au niveau du cytosol, de la vacuole et, dans une moindre mesure, au niveau des mitochondries (Bozzo et al, 2008).

#### 2- Recyclage du noyau ptérine

L'oxydation spontanée du THF conduit dans un premier temps à la formation de dihydroptérine-6-aldéhyde qui peut, elle-même, être oxydée en ptérine-6-aldéhyde (Figure 6). Ces deux molécules peuvent ensuite être réduites respectivement en hydroxyméthyl-dihydroptérine et hydroxyméthyl-ptérine. Cette dernière subit également une réduction pour former de l'hydroxyméthyl-dihydroptérine qui est réinjectée dans la voie de biosynthèse du folate (Figure 3, page 8). Les enzymes catalysant ces réactions de réduction sont appelées ptérine aldéhyde réductases (PTAR). L'activité PTAR semble confinée au niveau du cytosol (Noiriél et al, 2007). Récemment un gène codant potentiellement une PTAR a été identifié chez *Arabidopsis*. Le mutant knock-out pour ce gène candidat ne montre pas de phénotype particulier ni de diminution remarquable de l'activité PTAR, ce qui pourrait être expliqué par l'existence de multiples isoformes de cette protéine (Noiriél et al, 2007).



**Figure 6 :** Catabolisme du folate et voies potentielles de recyclage des produits de dégradation du folate.

Le clivage oxydatif du THF intervient au niveau de la liaison C-N marquée par un astérisque vert. Les réactions non enzymatiques sont indiquées par des flèches en pointillés alors que celles catalysées par des enzymes sont marquées par des flèches pleines. Le recyclage de la partie ptérine issue de la dégradation oxydative du THF est signalé en rouge et celle de la partie *p*-ABA en bleu.

GGH :  $\gamma$ -glutamyl hydrolase ; PGH : *para*-aminobenzoylglutamate hydrolase ; PTAR : ptérine aldéhyde réductase ; DHPS : dihydroptérote synthase ; DHF : dihydrofolate.

#### IV- Origines des unités monocarbonées.

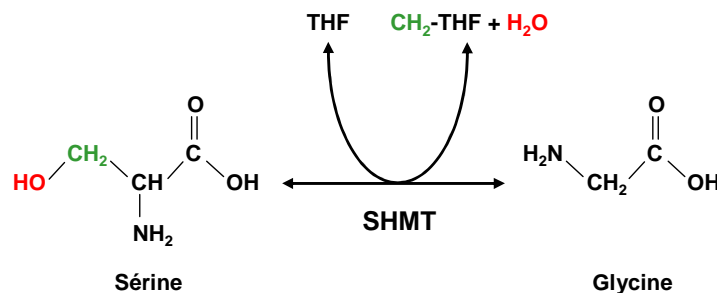
Les trois principaux donneurs de groupements C1 sont la sérine, la glycine et le formate. Chez les animaux, le catabolisme de l'histidine est également source d'unités C1. En effet, la formiminotransférase-cyclodéaminase est une enzyme bifonctionnelle qui catalyse deux réactions indépendantes. Dans un premier temps, elle réalise le transfert d'un groupement formimino du formiminoglutamate (un produit de la dégradation de l'histidine) sur le THF en position N<sub>5</sub> pour former une molécule de 5-formimino-THF. La deuxième réaction est une cyclodéamination du groupement formimino du composé précédant. Cette réaction aboutit à la formation de 5,10-CH<sup>+</sup>-THF. Aucune formiminotransférase-cyclodéaminase n'a encore été caractérisée chez la plante. La réalisation d'alignements de séquences protéiques nous a permis de mettre en évidence un gène candidat chez *Arabidopsis* mais l'indisponibilité dans le commerce des substrats de cette enzyme (le formiminoglutamate et le formimino-THF) rend la caractérisation fonctionnelle du produit de ce gène délicate.

##### 1- La glycine et la sérine

La glycine et la sérine sont deux acides aminés interconvertibles impliqués dans des réactions qui produisent des unités C1 sous la forme de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF (Rébeillé et Douce, 1999).

##### a- Incorporation d'unités C1 à partir de la sérine.

La sérine est la source principale d'unités C1 chez la plupart des organismes (Cossins et Chen, 1997). Son carbone 3 est transféré sur les N<sub>5</sub> et N<sub>10</sub> du THF-Glu<sub>n</sub> pour former du 5,10-CH<sub>2</sub>-THF-Glu<sub>n</sub> et de la glycine dans une réaction réversible catalysée par la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) (Figure 7).



**Figure 7:** Conversion sérine – glycine catalysée par la SHMT.

Chez *Arabidopsis*, 7 gènes ont été annotés comme étant des SHMT potentielles. Parmi celles-ci, deux présentent des séquences d'adressage putatives pour la mitochondrie et deux pour le plaste. Les trois autres SHMT sont dépourvues de séquence d'adressage prédictible et seraient donc potentiellement cytosoliques.

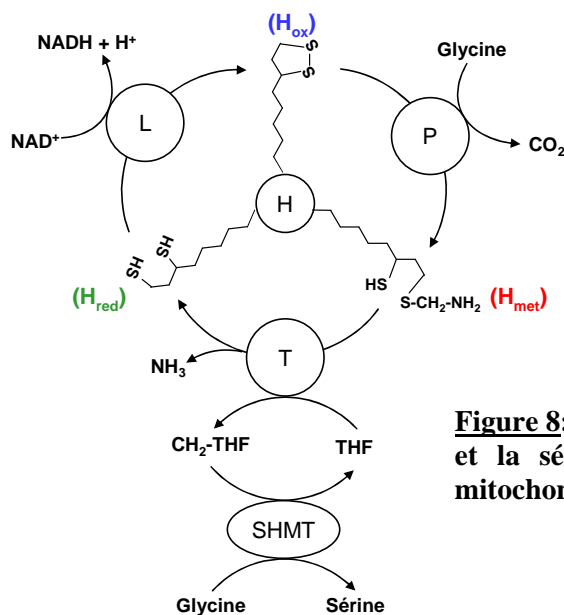
La conversion sérine-glycine catalysée par la SHMT est une réaction réversible (Figure 7) dont le sens va dépendre de la distribution des substrats. Ainsi dans la situation "classique", la réaction est largement favorisée dans le sens sérine vers glycine (Bauwe et Kolukisaoglu, 2003). *A contrario*, dans les mitochondries des tissus foliaires, où le flux de glycine issue de la photorespiration (cf § C-III) est très important (Douce et Neuburger, 1999), l'équilibre entre les deux acides aminés est inversé, favorisant de la sorte la formation de sérine à partir de glycine (Figure 8).



### b- Incorporation d'unités C1 à partir de la glycine.

L'oxydation de la glycine par la glycine décarboxylase (GDC), complexe multienzymatique présent en abondance dans la matrice mitochondriale des tissus foliaires (Kikuchi et al, 2008 ; Douce et al, 2001), conduit également à la formation de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF (Figure 8).

Le complexe GDC est formé de quatre protéines distinctes. La protéine P (protéine contenant un pyridoxal-phosphate) catalyse la décarboxylation de la glycine et le transfert de la partie méthylamine de la glycine sur le bras lipoamide oxydé de la protéine H (H<sub>ox</sub>). La protéine H chargée avec la méthylamine (H<sub>met</sub>) interagit ensuite avec la protéine T (protéine liant le THF) pour produire du NH<sub>3</sub> et du 5,10-CH<sub>2</sub>-THF. Le bras lipoamide est alors réduit (H<sub>red</sub>) et doit être oxydé à nouveau pour que le complexe puisse continuer à fonctionner. Cette oxydation est effectuée par la protéine L et conduit à la formation de NADH (Figure 8).



**Figure 8:** Réactions catalysées par la glycine décarboxylase et la sérine hydroxyméthyltransférase dans la matrice mitochondriale.

Toutes ces protéines ont été purifiées à partir de mitochondries de tissus foliaires de pois (Douce et al, 2001). Chez les plantes supérieures, ce complexe représente (en association avec la SHMT) 40% des protéines solubles des mitochondries (Douce et al, 2001). Chez *Arabidopsis*, deux gènes codant la protéine P, un gène codant la T, deux codant la L et trois codant la H ont été identifiés. Toutes ces protéines présentent une séquence d'adressage mitochondriale, ce complexe n'étant présent dans aucun autre compartiment.

La production de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF par la GDC ne correspond pas à une production nette d'unités C1. En effet, dans la mitochondrie, le couplage de la GDC et de la SHMT assure un recyclage quasi immédiat du 5,10-CH<sub>2</sub>-THF pour former une molécule de sérine à partir d'une molécule de glycine. Cette molécule de sérine est indispensable au cycle de la photorespiration. Si toutes les molécules de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF produites par la GDC n'étaient pas recyclées en sérine, on assisterait probablement à un désamorçage du cycle de la photorespiration et par la suite du cycle de Calvin (Bourguignon et al, 1999).

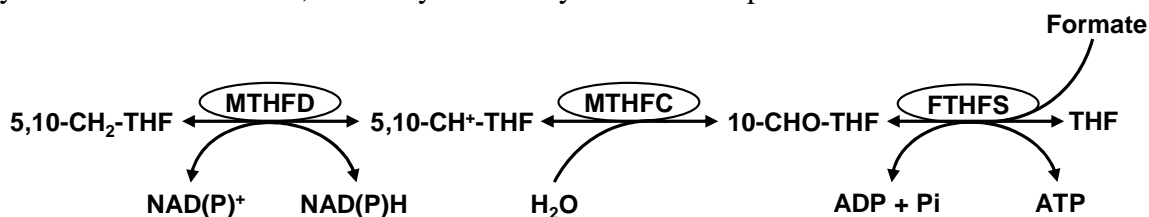
## 2- Le formate.

Le formate est un donneur potentiel de groupements C1 chez les plantes supérieures qui sont capables de le produire à partir de méthanol (Prabhu et al, 1996). La synthèse de 10-CHO-THF à partir du formate et du THF implique l'enzyme ATP-dépendante 10-formyl-tétrahydrofolate synthétase (FTHFS) (Figure 9). Chez les levures et les mammifères, la FTHFS est associée avec deux autres activités, la méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase et la méthényltétrahydrofolate cyclohydrolase, pour former une seule protéine trifonctionnelle appelée C1-THF synthase (Song et Rabinowitz, 1993). Cette protéine multifonctionnelle est présente chez la levure dans la mitochondrie et le cytosol (Shannon et Rabinowitz, 1986). Chez les procaryotes et les plantes supérieures, l'activité FTHFS est portée par une enzyme monofonctionnelle (Nour et Rabinowitz, 1992). Dans le génome d'*Arabidopsis*, trois gènes ont été annotés comme FTHFS mais un seul semble contenir tous les domaines nécessaires à la fonction de l'enzyme. Le cytosol, la mitochondrie et le chloroplaste possèdent tous les trois une activité FTHFS (Hanson et al, 2000).

## V- Interconversion des dérivés monocarbonés.

Chez les plantes, bien que le métabolisme C1 fasse intervenir 5 dérivés du THF différents, l'incorporation d'unités C1 ne se fait qu'au niveau de deux dérivés : le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF et le 10-CHO-THF. L'interconversion des différents dérivés du THF est donc un préalable aux différentes réactions du métabolisme C1.

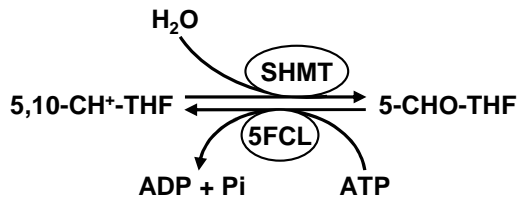
Les réactions de conversion entre 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, 5,10-CH<sup>+</sup>-THF et 10-CHO-THF sont catalysées par une enzyme bifonctionnelle portant les activités méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase (MTHFD) et méthylènetétrahydrofolate cyclohydrolase (MTHFC) (Figure 9) (Nour et Rabinowitz, 1991). Des études biochimiques réalisées sur des feuilles de pois ont localisé ces activités enzymatiques dans trois compartiments cellulaires: le plaste, la mitochondrie et le cytosol (Neuburger et al, 1996). Ainsi, la colocalisation des activités SHMT, MTHFD et MTHFC permet de subvenir aux besoins de la cellule en dérivés C1 nécessaires à la synthèse des nucléotides, de formyl-méthionyl-tRNA et de pantothénate.



**Figure 9 :** Réactions de conversion entre le THF, le 10-CHO-THF, le 5,10-CH<sup>+</sup>-THF et le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF.

FTHFS: 10-formyl-tétrahydrofolate synthétase; MTHFC : méthylènetétrahydrofolate cyclohydrolase; MTHFD: méthylènetétrahydrofolate déshydrogénase.

Le 5-CHO-THF (ou leucovorine) est formé à partir du 5,10-CH<sup>+</sup>-THF par l'hydrolyse enzymatique de la liaison entre le groupement CH<sup>+</sup> et le N<sub>10</sub> de la partie *p*-ABA (Figure 10). Cette réaction est catalysée par la SHMT; il s'agit là de la deuxième activité catalytique de cette enzyme. Le 5-CHO-THF est le dérivé du THF qui présente la plus grande stabilité. Il s'agit également d'un dérivé qui, à la connaissance générale, ne participe à aucune des réactions du métabolisme C1. Différents auteurs ont d'ailleurs suggéré que ce dérivé métaboliquement inactif est une forme de stockage du folate (Stover et Schirch, 1993).

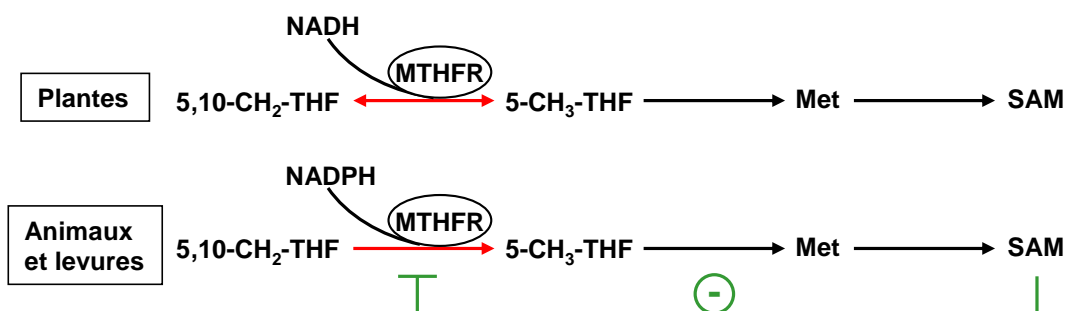


**Figure 10: Réactions de conversion entre le 5,10-CH<sup>+</sup>-THF et le 5-CHO-THF.**

SHMT: sérine hydroxyméthyltransférase; 5FCL: 5-formyltétrahydrofolate cycloligase.

La seule enzyme qui manipule le 5-CHO-THF est la 5-formyltétrahydrofolate cycloligase (5-FCL), également appelée 5,10-méthénylTHF synthétase. La 5-FCL réalise la réaction de conversion ATP-dépendante entre le 5-CHO-THF et le 5,10-CH<sup>+</sup>-THF (Figure 10). Jusqu'à présent, une seule 5-FCL, localisée dans la mitochondrie, a été caractérisée chez *Arabidopsis*. Le rôle de cette enzyme au sein de la mitochondrie est justifié par le fait que le 5-CHO-THF peut représenter jusqu'à 50% du pool mitochondrial de folates (Goyer et al, 2005). Néanmoins, nous avons localisé, en collaboration avec l'équipe de A. Hanson, une 5-FCL potentielle au niveau du chloroplaste (données non publiées).

La méthylèneTHF réductase (MTHFR) catalyse la réduction du 5,10-CH<sub>2</sub>-THF en 5-CH<sub>3</sub>-THF (Figure 11). Ce dérivé joue le rôle de cofacteur dans la synthèse de méthionine et permet donc, via la *S*-adénosylméthionine (SAM), d'alimenter les réactions de méthylation cellulaires en groupements CH<sub>3</sub>. Chez *Arabidopsis*, les 2 gènes codant pour la MTHFR ne présentent pas de séquence d'adressage, ce qui suggère une localisation cytosolique. Les MTHFR de plantes diffèrent de celles des autres eucaryotes en ceci qu'elles ne sont pas inhibées par la SAM et utilisent le NADH préférentiellement au NADPH (Roje et al, 1999) (Figure 11). Cette préférence pour le NADH ainsi que l'insensibilité à la SAM semblent indiquer que le contrôle du flux d'unités C1 vers le 5-CH<sub>3</sub>-THF est différent chez les plantes. En effet, la réaction catalysée par la MTHFR chez les mammifères et les levures est, d'un point de vue thermodynamique, clairement favorisée dans le sens du 5-CH<sub>3</sub>-THF, voire quasi irréversible. Ainsi l'inhibition de la réaction par la SAM permet d'empêcher un engagement quasi exclusif du 5,10-CH<sub>2</sub>-THF vers la synthèse de méthionine, ce qui serait délétère pour les autres réactions du métabolisme C1. Chez les plantes, la réaction catalysée par la MTHFR est réversible, un rétrocontrôle par la SAM n'est alors pas nécessaire pour maintenir le pool de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF (Roje et al, 1999).



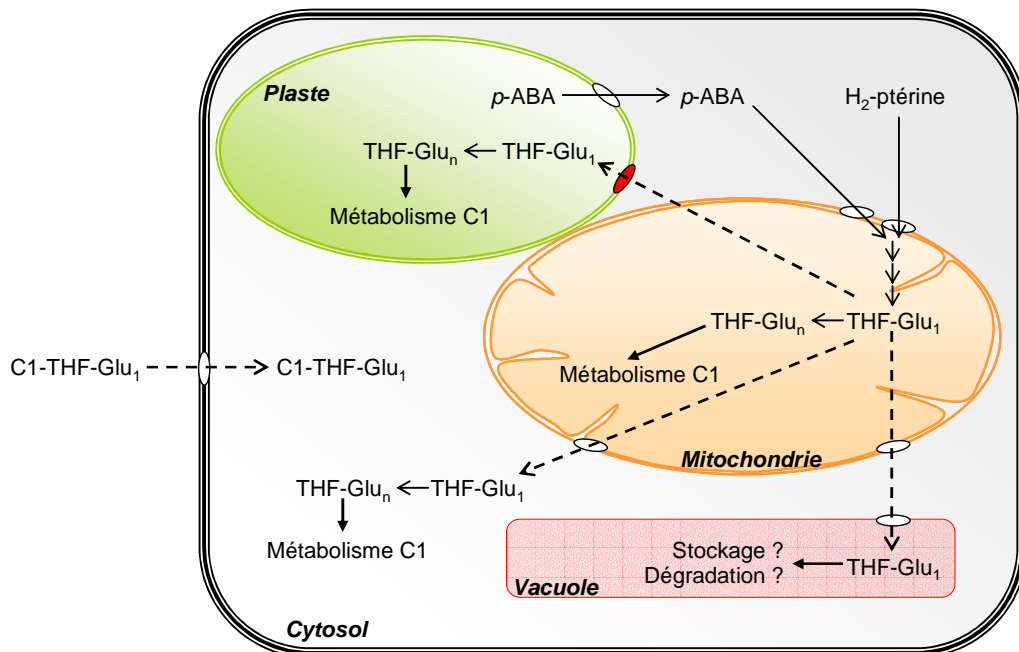
**Figure 11 : Interconversion entre le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF et le 5-CH<sub>3</sub>-THF.**

MTHFR: méthylèneTHF réductase; Met: méthionine; SAM: *S*-adénosylméthionine. L'inhibition de la MTHFR exercée par la SAM est indiquée en vert.

## VI- Trafic intracellulaire des folates.

Si les systèmes de transport du folate sont très bien connus chez les animaux et notamment chez les mammifères, la situation est tout à fait différente chez les plantes. En effet, jusqu'en 2005, aucun transporteur de folates d'origine végétale n'avait été identifié. Or, si le THF est synthétisé dans la mitochondrie, il participe aux réactions du métabolisme C1 qui ont lieu dans tous les compartiments cellulaires, ce qui suggère un trafic intracellulaire complexe du THF (Figure 12). Egalement, des études *in vivo* ont démontré que les cellules d'*Arabidopsis* ont la faculté de puiser certains folates dans le milieu de culture, ce qui suggère l'existence de système d'influx de folates dans la cellule végétale (Prabhu et al, 1998).

Les deux transporteurs de folate actuellement caractérisés chez les plantes sont localisés au niveau de l'enveloppe plastidiale (Figure 12) (Bedhomme et al, 2005 ; Klaus et al, 2005b). Ces transporteurs appartiennent à des familles différentes et leur fonction a été mise en évidence par des expériences d'expression en systèmes hétérologues (cellules animales, bactéries). Le premier de ces transporteurs (AtFOLT1) (Bedhomme et al, 2005) appartient à la famille des transporteurs mitochondriaux. Cette famille caractérisée par la présence de 6 hélices transmembranaires rassemble des transporteurs qui peuvent être localisés au niveau des mitochondries, mais aussi des péroxyosomes et des plastes. Le second transporteur (codé par le gène At2g32040) appartient à la famille des transporteurs de folate et de biptéridine, caractérisée à l'origine chez les protozoaires (Klaus et al, 2005b). Les mutants d'*Arabidopsis* pour chacun des deux transporteurs ne présentent pas de phénotype notable dans des conditions standard de culture. De plus, les chloroplastes de ces mutants présentent un statut en folates très proche de celui de chloroplastes de plantules sauvages. La situation semble donc relativement complexe puisque rien qu'au niveau de l'enveloppe du chloroplaste, il existe au moins deux transporteurs de folate.



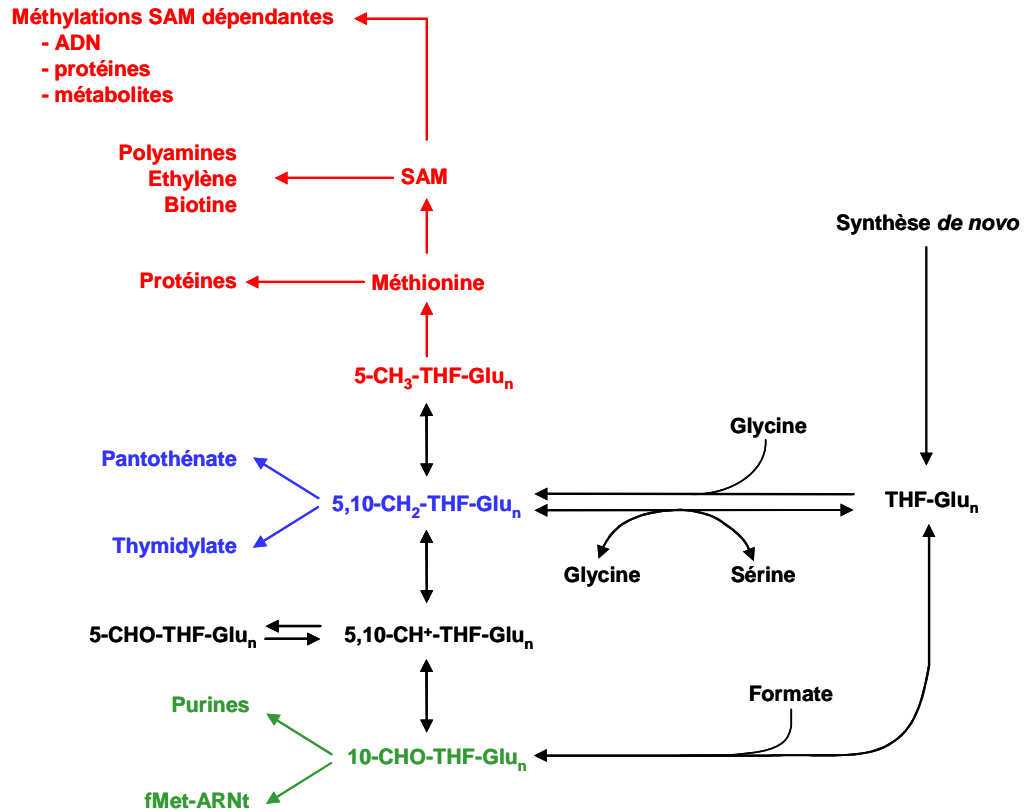
**Figure 12 : Systèmes de transport intra et extracellulaire du folate et de ses précurseurs.**

Seuls deux transporteurs de folates localisés sur l'enveloppe du plaste ont été identifiés (en rouge). La cellule végétale est également capable de puiser du folate dans le milieu de culture.

THF-Glu<sub>1</sub>: THF monoglutamylé; THF-Glu<sub>n</sub>: THF polyglutamylé; C1-THF: THF portant une unité C1.

### C- LE METABOLISME MONOCARBONE.

Le terme de métabolisme monocarboné (ou métabolisme C1) désigne l'ensemble des réactions dans la cellule qui nécessitent le transfert d'unités monocarbonées (unités C1).



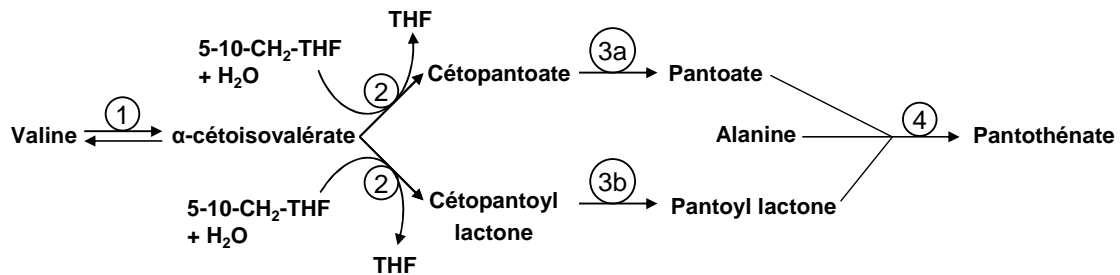
**Figure 13: Représentation du métabolisme monocarboné.**

Les réactions de transfert d'unités monocarbonées auxquelles participe le CH<sub>3</sub>-THF sont indiquées en rouge, celles impliquant le CH<sub>2</sub>-THF sont représentées en bleu et celles impliquant le CHO-THF sont indiquées en vert.

Chaque dérivé du THF est impliqué dans un nombre restreint de réactions du métabolisme C1 qui lui sont propres (Figure 13) (Cossins et Chen, 1997). Ainsi, le 10-CHO-THF est impliqué dans la synthèse des purines et du formyl-méthionyl-ARNt. Le 5-CH<sub>3</sub>-THF est le donneur de groupements méthyles pour la synthèse de la méthionine (Cossins et Chen, 1997). Le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF est impliqué dans la synthèse du thymidylate, du pantothénate ainsi que dans la conversion de la sérine en glycine. Le 5-CHO-THF ainsi que le 5,10-CH<sup>+</sup>-THF ne sont pas impliqués directement dans les réactions de transfert d'unités C1 (Goyer et al, 2005), cependant ce dernier fait office de chromophore. En effet, des études, menées entre autres chez *E. coli* et *Arabidopsis*, ont démontré que le 5,10-CH<sup>+</sup>-THF joue le rôle d'antenne collectrice de lumière dans les cryptochromes (Pokorny et al, 2005). Les cryptochromes sont les récepteurs de la lumière bleue chez les plantes, les bactéries et les animaux et constituent un élément clé du rythme circadien.

## I- Synthèse du pantothénate.

Le pantothénate, que l'on appelle également vitamine B5, est synthétisé *de novo* uniquement par les plantes et certains microorganismes. Il est le précurseur clé de la synthèse du CoA et de l'ACP (Acyl Carrier Protein) (Raman et Rathinasabapathi, 2004). Le CoA est utilisé dans le métabolisme des lipides, la synthèse des stéroïdes, le cycle de Krebs et le métabolisme de certains acides aminés (leucine) (Tahiliani et Beinlich, 1991). L'ACP est surtout impliqué dans la synthèse des acides gras.



**Figure 14 : Représentation simplifiée de la voie de biosynthèse du pantothénate.**

1: Aminotransférase ; 2: Cétopantoate hydroxyméthyltransférase ; 3a: Cétopantoate réductase ; 3b: Cétopantoate lactone réductase, 4: Pantothénate synthétase.

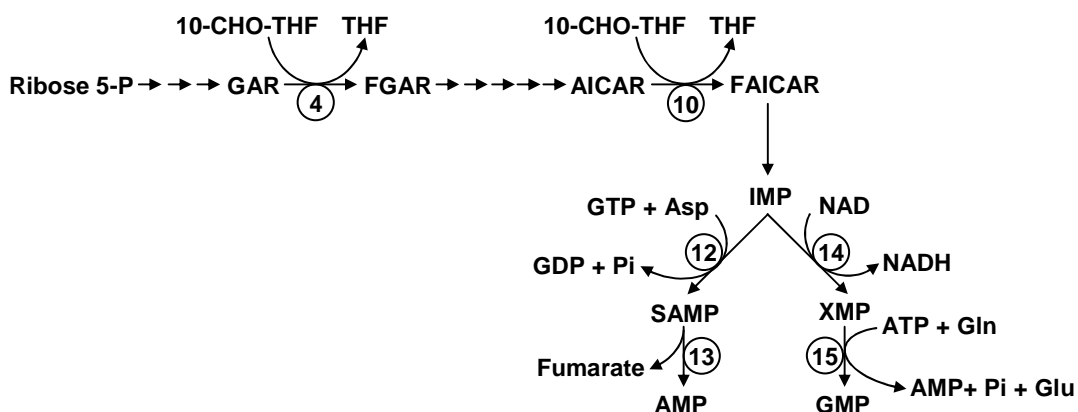
La voie de biosynthèse du pantothénate est bien connue chez les bactéries et notamment chez *E. coli*, mais la littérature reste encore confuse concernant la synthèse *de novo* de cette vitamine chez les plantes. Cependant, différents auteurs semblent s'accorder sur le fait que la synthèse du pantothénate chez les plantes se déroule en 4 étapes à partir de la valine (Figure 14) (Julliard, 1994; Raman et Rathinasabapathi, 2004). Dans un premier temps, cette dernière est convertie en  $\alpha$ -cétoisovalérate par une aminotransférase non spécifique lors d'une réaction réversible. La seconde réaction est catalysée par la cétopantoate hydroxyméthyltransférase qui, à partir de cétoisovalérate et de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, produit une molécule de cétopantoate en libérant du THF. Deux isoformes mitochondriales de cette enzyme ont été identifiées chez *Arabidopsis* (Coxon et al, 2005). La suite de la synthèse de pantothénate se situe dans le cytosol où le cétopantoate subit une étape de réduction pour former du pantoate, lequel est combiné à la  $\beta$ -alanine par une pantothénate synthétase pour finalement obtenir du pantothénate. Selon certains auteurs, il pourrait exister une voie alternative lors de laquelle les étapes 3 et 4 se situeraient dans le stroma. En effet la cétopantoate hydroxyméthyltransférase y produirait de la cétopantonyl lactone (King et Wilken, 1972), laquelle serait ensuite réduite en pantoyl lactone (Julliard, 1994). De plus, il existerait deux isoformes de la pantothénate synthétase, l'une localisée dans le plaste et transformant la pantoyl-lactone en pantothénate, et l'autre, cytosolique, utilisant le pantoate comme substrat.

## II- Synthèse des nucléotides et du formylméthionyl-ARNt.

La synthèse du noyau purique tient un rôle central au sein du métabolisme de tout organisme. En effet, l'adénylate monophosphate (AMP) et le guanydilate monophosphate (GMP) sont à l'origine des éléments structuraux essentiels de l'ADN et de l'ARN. Ils intègrent également la structure de nombreux cofacteurs (NAD(P), FAD, SAM et CoA) ainsi que celle de molécules jouant un rôle de signalisation (cAMP). L'AMP et le GMP participent également au métabolisme énergétique de la cellule lorsqu'ils sont phosphorylés (ADP/ATP et GDP/GTP).

### 1- Synthèse de l'AMP et du GMP.

Les deux bases puriques, l'AMP et le GMP, sont synthétisées chacune en deux étapes à partir d'un même précurseur : l'inosine monophosphate (IMP). La synthèse *de novo* d'IMP à partir du ribose-5-phosphate nécessite 11 étapes (Figure 15) dont 2 sont des réactions de formylation nécessitant la participation du 10-CHO-THF (Zrenner et al, 2006). En effet, dans la quatrième étape, la GAR transformylase catalyse la formation de formylglycine ribonucléotide à partir de 10-CHO-THF et de glycine ribonucléotide (GAR). Dans la dixième, l'AICAR transformylase catalyse la synthèse de N-formylaminoimidazol-4-carboxamide ribonucléotide à partir de l'aminimidazol-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) et du 10-CHO-THF. Cette activité AICAR transformylase est portée par une enzyme bifonctionnelle qui catalyse également la onzième et dernière activité de synthèse de l'IMP : l'IMP cyclohydrolase.



**Figure 15 : Représentation simplifiée de la synthèse des bases puriques.**

4: GAR transformylase; 10: AICAR transformylase; 12: SAMP synthétase; 13: Adénosuccinate lyase; 14: IMP déshydrogénase; 15: GMP synthase; Ribose 5-P: ribose 5-phosphate; GAR: glycine ribonucléotide; FGAR: formylglycine ribonucléotide; AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamide ribonucléotide; FAICAR: N-formylaminoimidazol-4-carboxamide ribonucléotide; IMP: inosine monophosphate; Asp: Aspartate; SAMP: Adénylosuccinate; XMP: Xanthosine monophosphate; Gln: Glutamine; Glu: Glutamate.

Chez les animaux et les champignons, la synthèse *de novo* de purine se déroule dans le cytosol. Chez les plantes, la situation semble différente. En effet, l'analyse des séquences protéiques des enzymes impliquées dans cette synthèse *de novo* indique que la formation d'IMP ainsi que celle d'AMP se déroule dans les plastes alors que la synthèse de GMP a lieu dans le cytosol. Les deux étapes folates-dépendantes de cette synthèse sont donc plastidiales.

## 2- Synthèse du thymidylate.

Le thymidylate joue un rôle unique mais essentiel puisqu'il intervient dans la composition de l'ADN. C'est pourquoi l'enzyme qui catalyse sa formation, la thymidylate synthase (TS) est la cible de certains agents anticancéreux (le 5-fluorouracil par exemple). La TS réalise la dernière étape de la synthèse *de novo* du thymidylate: la méthylation du dUMP en dTMP. Lors de cette réaction, le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, qui tient lieu de cofacteur à la TS, subit, en plus de sa déméthylation, une réduction qui le fait passer sous la forme DHF. Ainsi, pour maintenir la synthèse d'ADN, la cellule doit absolument réduire à nouveau la molécule de DHF en THF, action réalisée par la DHFR (Figure 4, page 11). Chez la plupart des organismes, la TS et la DHFR sont des enzymes monofonctionnelles alors que chez les plantes les deux activités sont rassemblées sur une enzyme bifonctionnelle, la DHFR-TS, dont il existerait des isoformes dans la mitochondrie, le plaste et le cytosol. Cela suggère une distribution multi-compartimentée de la synthèse *de novo* de thymidylate alors que chez les animaux elle est exclusivement cytosolique (Appling, 1991; Sahr et al, 2005).

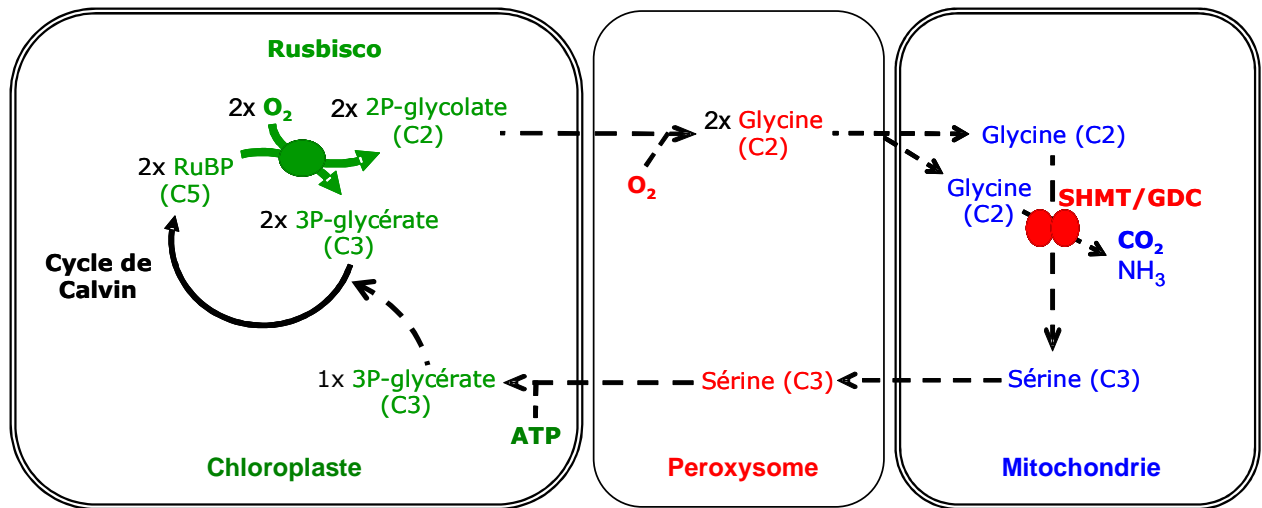
## 3- Synthèse du formylméthionyl-ARNt.

Pour permettre l'initiation de la traduction chez les procaryotes ainsi que dans les mitochondries et les plastes, le méthionyl-ARNt doit être formylé sur la méthionine (ARNt<sup>fMet</sup>) (Cossins, 2000). Cet ARNt est différent de celui qui transfère les résidus méthionine internes à la protéine, bien qu'il reconnaisse le même codon AUG. La synthèse de cet ARNt initiateur dans les plastes et les mitochondries végétales est semblable à celle décrite dans les mitochondries eucaryotes: lorsque la méthionine est liée à l'ARNt, une méthionyl-tRNA transformylase spécifique ajoute un groupe formyle sur le NH<sub>2</sub> libre de la méthionine (Giglione et Meinnel, 2001). Pour initier la traduction, l'ARNt<sup>fMet</sup> se fixe sur le codon AUG initiateur. Puis, lorsqu'un peptide de 4 à 5 acides aminés est formé, une activité peptide déformylase supprime le groupe formyle de la première méthionine. Sans cette action, la méthionine initiatrice ne peut plus être clivée, ce qui peut conduire à de graves anomalies dans le développement de la plante (Giglione et Meinnel, 2001).

## III- La photorespiration.

L'assimilation du CO<sub>2</sub> par les plantes lors du cycle de Calvin débute par une réaction de carboxylation du ribulose 1,5 biphosphate. Cette réaction est catalysée par la Rubisco (ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/ oxygénase) qui possède également une activité oxygénase. Les deux activités de la Rubisco s'expriment en même temps, mais l'oxygénation du ribulose ne permet pas d'injecter de carbone dans le cycle de Calvin (Figure 16) et peut donc conduire au désamorçage de celui-ci. Le cycle photorespiratoire permet de récupérer 75% du carbone présent dans le 2P-glycolate produit par l'activité oxygénase de la Rubisco (Figure 16), ce qui permet au cycle de Calvin de continuer à tourner (Douce et al, 2001). La photorespiration se déroule dans trois organites différents (Figure 16): le chloroplaste, le péroxysome et la mitochondrie. Les étapes mitochondriales du cycle photorespiratoire comportent deux réactions folate-dépendantes qui sont essentielles puisqu'elles permettent la conversion de deux molécules de glycine (2 carbones) en une sérine (3 carbones). Dans ces réactions, la conversion de la glycine en sérine est catalysée par la SHMT, réaction qui requiert l'addition d'une unité monocarbonée. Cette unité monocarbonée provient de l'oxydation d'une seconde molécule de glycine par la GDC (Figure 8, page 17) (Douce et Neuburger, 1999).





**Figure 16** : Représentation simplifiée du cycle de Calvin et du cycle photorespiratoire.

Seule l'activité oxygénase de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/ oxygénase (Rubisco) est représentée ici. RuBP: ribulose 1,5 biphosphate; SHMT: sérine hydroxyméthyltransférase; GDC: glycine décarboxylase. Les réactions catalysées par ces deux dernières enzymes sont détaillées Figure 8.

#### IV- Synthèse de la méthionine et cycle des méthyles.

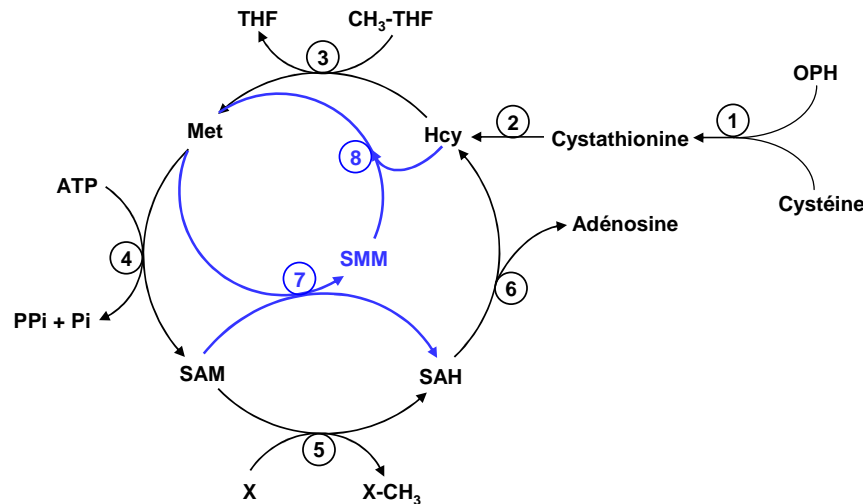
Dans la plupart des situations physiologiques, le flux d'unités C1 le plus important est celui qui alimente la synthèse de méthionine (Figure 13, page 21). En effet, outre son incorporation dans les protéines, cet acide aminé essentiel est également le précurseur de la *S*-adénosylméthionine (SAM), molécule qui tient lieu de donneur universel de groupements méthyles dans la totalité des réactions de méthylation qui se déroulent dans la cellule. Cet aspect du métabolisme C1 sera plus largement développé dans la suite de ce manuscrit.

Chez les plantes, la SAM participe également à la synthèse d'autres métabolites. En effet, cette molécule fait office de donneur de groupement aminopropyl lors de la synthèse des polyamines (spermine, spermidine) (Roje, 2006). Bien que le mode d'action des polyamines soit encore mal connu, il semblerait que ces molécules soient impliquées dans la réponse de la plante à différents stress environnementaux (Kasukabe et al, 2004).

La SAM en tant que donneur de groupement aminopropyl, participe également à la synthèse d'éthylène. En effet, la première enzyme de synthèse de cette phytohormone, l'ACC synthase, convertit la SAM en ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique). Puis l'ACC oxydase oxyde l'ACC pour former de l'éthylène. Cette molécule est d'une grande importance car elle est impliquée dans de nombreux aspects du développement de la plante (germination, développement racinaire, murissement du fruit, sénescence...) (De Paepe et Van Der Straeten, 2005).

La SAM est également utilisée par de nombreuses enzymes comme donneur de radicaux déoxyadénosyl. En effet, certaines enzymes comme la biotine synthase clivent la SAM, ce qui produit de la méthionine ainsi qu'un radical 5'-déoxyadénosyl. Cet intermédiaire réactionnel réagit ensuite avec le substrat spécifique de l'enzyme. Dans le cas de la biotine synthase, il s'agit de la déthiobiotine, le produit final de la réaction étant la biotine (vitamine B8) (Picciocchi et al, 2001).

Chez les plantes, il existe trois voies de biosynthèse de méthionine. La première est la voie de synthèse *de novo* à partir de cystéine, d'*O*-phosphohomosérine (OPH) et de 5-CH<sub>3</sub>-THF (Figure 17). La seconde voie consiste en un recyclage de la *S*-adénylhomocystéine (SAH) suite à l'utilisation de la SAM lors du cycle des méthyles (Figure 17). Il est intéressant de noter que ces deux voies de synthèse ont une étape commune: la méthylation de l'homocystéine (Hcy) par la méthionine synthase. Cette réaction est folate-dépendante et fait intervenir le 5-CH<sub>3</sub>-THF. La troisième voie qui permet la formation de méthionine est spécifique des plantes. Il s'agit du cycle de la *S*-méthylméthionine (SMM) (Figure 17).



**Figure 17 : Biosynthèse de la méthionine et cycle des méthyles.**

La biosynthèse *de novo* de la méthionine fait intervenir successivement la cystathionine  $\gamma$  synthase (1), la cystathionine  $\beta$  lyase (2), et l'isoforme chloroplastique de la méthionine synthase (3). Le cycle des méthylation est réalisé par la SAM synthétase (4), les méthyltransférases dépendantes de la SAM (5), la *S*-adénylhomocystéine (SAH) hydrolase (6), la méthionine synthase cytosolique (3). Le cycle de la *S*-méthylméthionine (SMM) (en bleu) est constitué de la méthionine *S*-méthyltransférase (7) et de l'homocystéine *S*-méthyltransférase (8). OPH : *O*-phosphohomosérine; Hcy: Homocystéine.

### 1- La synthèse *de novo* de méthionine.

La méthionine fait partie des acides aminés dits essentiels. En effet, seules les plantes et la plupart des microorganismes possèdent les deux premières enzymes dédiées à la synthèse *de novo* de méthionine. Cette synthèse *de novo* se déroule en trois étapes à partir d'OPH, de cystéine et du 5-CH<sub>3</sub>-THF. L'OPH est un acide aminé dérivé de l'aspartate qui constitue le point de branchement entre les voies de synthèse de la méthionine et de la thréonine chez les plantes puisqu'il est le substrat commun de la cystathionine  $\gamma$ -synthase et de la thréonine synthase.

#### a- La cystathionine $\gamma$ -synthase.

La cystathionine  $\gamma$ -synthase (CGS) (Figure 17, étape 1) est une enzyme à pyridoxal-phosphate qui catalyse la formation de cystathionine à partir de cystéine et d'OPH. Cette enzyme est présente uniquement dans le stroma des plastes (Ravanel et al, 1998a). La CGS végétale mature, c'est-à-dire dépourvue de son peptide d'adressage, est un tétramère formé de sous-unités identiques de 53 kDa. La partie N-terminale de l'enzyme végétale mature est absente des protéines bactériennes homologues et constitue un domaine de régulation impliqué dans le

contrôle de la stabilité de l'ARNm codant la CGS. Nous développerons plus en détails cette partie lors du chapitre III.

#### **b- La cystathionine $\beta$ -lyase.**

La cystathionine  $\beta$ -lyase (CBL) (Figure 17, étape 2) catalyse le clivage au niveau du carbone  $\beta$  de la cystathionine pour former l'Hcy et libérer du pyruvate et de l'ammoniac. Chez l'épinard, deux enzymes situées respectivement dans le cytosol et dans les chloroplastes sont capables de cliver les composés possédant une liaison carbone-soufre (Droux et al, 1995). Cependant, seule l'enzyme chloroplastique clive efficacement la cystathionine et est donc impliquée dans la synthèse *de novo* de la méthionine, l'enzyme située dans le cytosol présentant en fait une activité cystine  $\beta$ -lyase (Ravanel et al, 1996). Le génome d'*Arabidopsis* ne présente qu'un seul gène codant pour une CBL. La séquence polypeptidique de l'enzyme mature montre une forte homologie (28 à 36% d'identité) avec les CGS de plantes et de bactéries ainsi qu'avec la cystathionine  $\gamma$ -lyase de *Saccharomyces cerevisiae*. Toutes ces enzymes sont impliquées dans les voies de synthèse de la cystéine et de la méthionine et appartiennent à une même classe d'enzymes à pyridoxal-phosphate (Alexander et al, 1994), ce qui suggère l'existence d'un ancêtre commun entre la CGS et la CBL de plante.

#### **c- La méthionine synthase chloroplastique.**

La méthionine synthase (MS) (Figure 17, étape 3) intervient pour synthétiser la méthionine à partir de l'Hcy synthétisée *de novo* ou formée au cours du cycle des méthyles. Des isoformes distinctes situées dans des compartiments différents assurent ces deux fonctions.

Chez *Arabidopsis*, un seul gène code pour la MS impliquée dans la synthèse *de novo* de la méthionine et cette enzyme est localisée dans le stroma des chloroplastes (Ravanel et al, 2004). Le plaste est ainsi le seul organite autonome pour la synthèse *de novo* de méthionine. La MS chloroplastique est de type cobalamine-indépendante et elle ne peut utiliser efficacement que les dérivés polyglutamates du 5-CH<sub>3</sub>-THF comme substrats.

### **2- Le cycle des méthyles.**

Le cycle des méthyles comprend 4 étapes (Figure 17). La première réaction consiste en la synthèse de SAM, composé qui va être utilisé principalement pour permettre les réactions de méthylation cellulaires. Les méthylations SAM-dépendantes conduisent à la formation de SAH qui est convertie en Hcy puis recyclée en méthionine lors du cycle des méthyles.

#### **a- La S-adénosylméthionine synthétase.**

La S-adénosylméthionine synthétase (SAMS) (Figure 17, étape 4) catalyse la conversion ATP-dépendante de la méthionine en SAM, Pi et PPI. Chez toutes les plantes étudiées jusqu'à présent la SAMS est codée par une famille multigénique (Schroder et al, 1997). A titre d'exemple 4 gènes codant pour la SAMS ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Aucune des séquences primaires de SAMS d'origine végétale ne possède de peptide d'adressage vers un organite, ce qui suggère une localisation exclusivement cytosolique de cette réaction, comme c'est le cas chez les autres organismes eucaryotes.

#### **b- Les réactions de méthylations.**

La SAM est au cœur du métabolisme C1 puisqu'elle est le donneur universel de groupements méthyles au cours des réactions de méthylation. Chez tous les organismes vivants, ces réactions touchent de nombreux métabolites et macromolécules telles que les acides nucléiques et les protéines.

Chez les procaryotes, l'ADN peut être méthylé au niveau des résidus adénine de certaines séquences qui sont alors protégées contre les enzymes de restriction. Ces méthylations participent également aux mécanismes de réparation de l'ADN, à sa réplication et à la régulation de l'expression de quelques gènes (Buryanov et Shevchuk, 2005).

Chez les eucaryotes supérieurs, l'ADN peut être méthylé non pas sur les adénines mais sur les résidus cytosine situés généralement au niveau d'îlots CpG. Cependant, les méthyltransférases de plantes ne ciblent pas spécifiquement ces îlots et ont la capacité d'agir sur des cytosines situées dans d'autres contextes. Les méthylations de l'ADN constituent les modifications chimiques les plus fréquentes des génomes eucaryotes et sont transmises de génération en génération. Chez les plantes, ces méthylations se retrouvent généralement au niveau de séquences répétées et de transposons. Lorsqu'elles interviennent au niveau des régions 5' non codantes, elles sont, la plupart du temps, associées à une répression de l'expression du gène correspondant (Saze, 2008). Chez les mammifères, les méthylations de l'ADN jouent un rôle très important notamment lors du développement de l'embryon, dans la régulation de l'expression génique et dans l'inactivation du chromosome X. Une altération des méthylations de l'ADN entraîne donc de graves conséquences et est généralement associée au vieillissement de l'organisme et / ou aux premiers stades de l'apparition de cancers (Sulewska et al, 2007).

Outre les méthylations de l'ADN, les régulations épigénétiques peuvent être conduites *via* des modifications covalentes des histones. En effet, les histones peuvent être méthylées, mais également acétylées, phosphorylées et ubiquitinylées, sur certains résidus présents au niveau des extrémités C et N-terminales. Ces modifications modulent l'état de condensation de la chromatine mais n'entraînent pas obligatoirement une répression de l'expression des gènes concernés (Saze, 2008). En effet, de nombreuses équipes dans le monde étudient actuellement l'effet épigénétique des différentes modifications possibles des histones en fonction de la nature de la modification mais également de la position du résidu modifié. L'ensemble des combinaisons "nature de la modification / résidu modifié" constitue ce que l'on appelle le "code histone".

Il a également été démontré que de nombreuses protéines autres que les histones sont méthylées *in vivo*. Ces méthylations peuvent être portées par des résidus lysine et arginine internes à la séquence protéique mais ces modifications post-traductionnelles peuvent également intervenir au niveau des extrémités N et C-terminales des protéines. Même si le nombre de protéines méthylées est très important, à ce jour, le rôle de ces méthylations reste encore mal connu. Des études menées sur différentes protéines semblent tout de même indiquer que les méthylations protéiques touchent un grand nombre de fonctions au sein de la cellule. Ainsi, il semble que ces modifications interviennent lors de la transduction de signaux, de la prolifération cellulaire, de la synthèse de myéline (Paik et al, 2007). Il apparaît également que les protéines de choc thermique sont méthylées en situation de stress, que la méthylation des cytochromes c augmente leur stabilité *in vivo*. Les interactions protéine / protéine, ARN / protéine et protéine / membrane lipidique sont également influencées par les méthylations protéiques (Grillo et Colombatto, 2005).

Le métabolisme lipidique est lui aussi très largement concerné par les méthylations SAM-dépendantes. En effet, la phosphatidylcholine, qui est le phospholipide majeur des membranes biologiques, est synthétisé à partir de phosphatidyléthanolamine par 3 réactions successives de méthylations (Vance et al, 1998).

D'autres réactions de méthylation sont spécifiquement présentes chez les plantes. Par exemple des réactions de méthylation sont nécessaires pour la formation de certains pigments photosynthétiques, comme les chlorophylles (Block et al, 2002), pour la synthèse de certains

constituants de la paroi comme les pectines (Goubet et al, 1998) et les lignines (Zhong et al, 1998). La biosynthèse des tocophérols (vitamine E) et des plastoquinones fait également intervenir des méthyltransférases SAM-dépendantes (Cheng et al, 2003).

Dans la plupart des situations physiologiques, le 5-CH<sub>3</sub>-THF est le dérivé de THF le plus abondant au sein de la cellule, ce qui suggère que la demande en unités CH<sub>3</sub> est très importante et que les réactions de méthylation représentent le flux principal d'unités C1. A titre d'exemple, des expériences d'incorporation de méthionine radioactive chez *Lemna* montrent que seulement 19 % de la méthionine marquée se retrouve dans les protéines (Mudd et Datko, 1986). En revanche 75 % de la méthionine marquée est utilisée dans les réactions de transméthylation. Les méthylation lors de la synthèse des dérivés de l'éthanolamine, choline, phosphocholine et phosphatidylcholine, représentent 46 % de ces réactions, les méthylation des pectines 18 %, les méthylation de la chlorophylle 8 %, les méthylation des acides nucléiques 2 à 5 % et les réactions de méthylation des acides aminés 2 %.

Le nombre et la diversité des réactions de méthylation SAM-dépendantes au sein de la cellule expliquent que le génome d'*Arabidopsis* présente plus de 100 gènes codants pour des méthyltransférases.

#### **c- La S-adénylhomocystéine hydrolase.**

La SAH produite au cours des réactions de méthylation est un inhibiteur compétitif des méthyltransférases SAM-dépendantes et doit donc être éliminée rapidement. Cette élimination est assurée par la S-adénylhomocystéine hydrolase (SAHH) (Figure 17, étape 6) qui catalyse l'hydrolyse de la SAH en Hcy et adénosine. *In vivo* et dans des conditions physiologiques, l'équilibre thermodynamique de la réaction catalysée par la SAHH va majoritairement dans le sens de la synthèse d'Hcy (Pereira et al, 2007). Chez *Arabidopsis*, deux gènes codent pour des SAHH qui ne possèdent pas de séquence d'adressage identifiable et sont donc vraisemblablement localisées dans le cytosol.

#### **d- Les méthionine synthases cytosoliques.**

La MS intervient pour clore le cycle des méthyles en assurant une synthèse de méthionine à partir de l'Hcy régénérée dans le cytosol (Figure 17, étape 3). L'enzyme qui intervient dans le cycle des méthyles est différente de celle qui participe à la synthèse *de novo* de la méthionine puisqu'elle est située dans le cytosol. La MS cytosolique, dont il existe deux isoformes chez *Arabidopsis*, possède une activité cobalamine-indépendante qui fonctionne exclusivement avec les formes polyglutamates du 5-CH<sub>3</sub>-THF (Ravanel et al, 2004).

### **3- Le cycle de la SMM.**

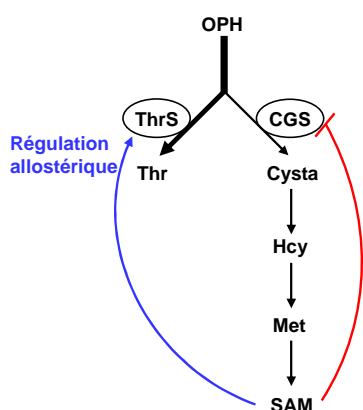
Ce cycle comporte deux étapes se déroulant dans le cytosol : dans un premier temps, la méthionine S-méthyltransférase (MMT) utilise une molécule de SAM pour méthyler une méthionine, ce qui aboutit à la formation d'une molécule de S-méthylméthionine (SMM) et d'une SAH (Figure 17, étape 7). La deuxième réaction du cycle est catalysée par l'homocystéine méthyltransférase (HMT) qui forme deux méthionines à partir de SMM et d'Hcy (Figure 17, étape 8). Le génome d'*Arabidopsis* possède 1 gène codant pour la MMT et 3 gènes codant pour des HMT, toutes ces protéines étant prédites pour être cytosoliques (Ranocha et al, 2001).

La MMT ainsi que le cycle de la SMM ne sont présents que chez les plantes. Cependant, les bactéries, les levures et les mammifères possèdent une HMT qui leur permettrait vraisemblablement de recycler la SMM d'origine végétale en méthionine (Ranocha et al, 2000).

Différents rôles ont été attribués à la SMM: elle serait notamment une forme de transport de la méthionine dans le phloème entre les tissus végétatifs et la graine (Bourgis et al, 1999), ce qui supposerait cependant une séparation dans le temps et l'espace des réactions catalysées par la MMT et par la HMT. D'autres auteurs ont formulé l'hypothèse selon laquelle la SMM serait un moyen de contrôler le niveau de SAM (Ranocha et al, 2001 ; Rébeillé et al, 2006). Une étude menée sur des mutants d'*Arabidopsis* KO pour la MMT, qui ne présentent pas de phénotype particulier, semble indiquer que le cycle de la SMM n'est pas essentiel à la croissance et au développement de la plante (Kocsis et al, 2003).

#### 4- Régulation de la synthèse de méthionine.

La méthionine fait partie de la famille des acides aminés dérivés de l'aspartate, tout comme la lysine, la thréonine et l'isoleucine. Les voies de biosynthèse de ces acides aminés sont complexes et comprennent de nombreux points de régulation (Curien et al, 2008; Goto et al, 2005). En particulier, nous allons voir que la biosynthèse de méthionine est une voie très finement régulée et que les différents mécanismes de régulation sont étroitement liés (Figure 18).



**Figure 18 :** Schéma simplifié des régulations intervenant au niveau du point de branchement entre la CGS et la ThrS.

En rouge : la régulation post transcriptionnelle de la CGS exercée par la SAM grâce au domaine MTO1. En bleu : le rôle d'activateur allostérique de la SAM sur la ThrS.

ThrS: thréonine synthase; Thr: thréonine; Cysta: cystathionine.

##### a- Compétition entre cystathionine $\gamma$ -synthase et thréonine synthase.

L'OPH constitue, chez les plantes, le point de branchement entre la synthèse *de novo* de méthionine et celle de thréonine. En effet, l'OPH est le substrat commun pour lequel la CGS et la thréonine synthase (ThrS) sont en compétition. Ce point de branchement constitue l'un des nœuds de régulation de la synthèse de méthionine (Figure 18).

La SAM, parmi les fonctions qu'elle assure au sein de la cellule, joue également le rôle de régulateur allostérique de la thréonine synthase. *In vitro*, il a été démontré que la SAM permettait d'augmenter 8 fois l'activité catalytique de la ThrS et de diminuer son  $K_m$  pour l'OPH de 25 fois (Curien et al, 1998). En 2003, Curien et al ont proposé, et validé par des expériences *in vitro*, un modèle mathématique du point de branchement entre la voie de biosynthèse de méthionine et celle de thréonine. Suivant ce modèle, il apparaît qu'une variation de la concentration en SAM modifie la partition du flux d'OPH entre la CGS et la ThrS. A la concentration physiologique de SAM dans les chloroplastes de feuilles illuminées (20  $\mu\text{M}$ ), le flux d'OPH vers la ThrS est supérieur à celui qui alimente la CGS. De faibles variations de la concentration en SAM ( $\pm 50\%$ ) autour de la concentration physiologique présentent des répercussions importantes sur le flux d'OPH. Ainsi, une augmentation de la concentration de SAM augmente le flux d'OPH vers la ThrS. *A contrario*, lorsque la concentration en SAM descend en dessous de la concentration physiologique, le flux d'OPH en direction de la CGS est favorisé au détriment de la ThrS.

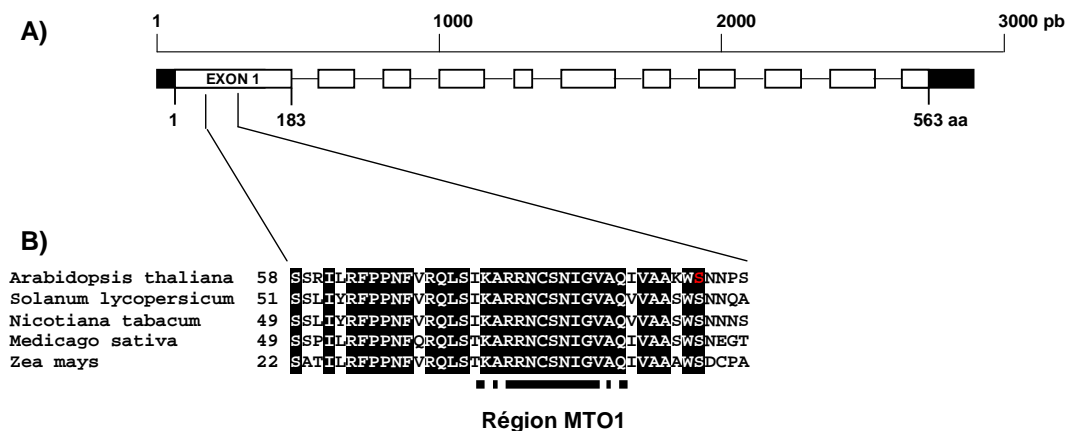
Selon cette même étude (Curien et al, 2003), il apparaît également que la partition du flux d'OPH est sensible à la concentration des enzymes du point de branchement et plus particulièrement à celle de la CGS. Ainsi une augmentation de la concentration en CGS, et donc une augmentation de l'activité CGS, favorise le flux d'OPH en direction de la synthèse de méthionine alors qu'une augmentation de la concentration en ThrS dirige préférentiellement le flux d'OPH vers la synthèse de thréonine.

Le mutant d'*Arabidopsis* nommé méthionine over-accumulation 2 (*mto2*) présente une mutation au niveau du gène codant pour la ThrS qui conduit à une diminution de l'activité de cette enzyme (Goto et al, 2005). *mto2* possède donc une activité ThrS réduite et produit moins de thréonine qu'une plante sauvage mais accumule également plus de méthionine. La caractérisation de ce mutant confirme *in planta* les conclusions obtenues *in vitro* selon lesquelles la partition du flux d'OPH dépend de l'activité de la ThrS.

### b- Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la CGS.

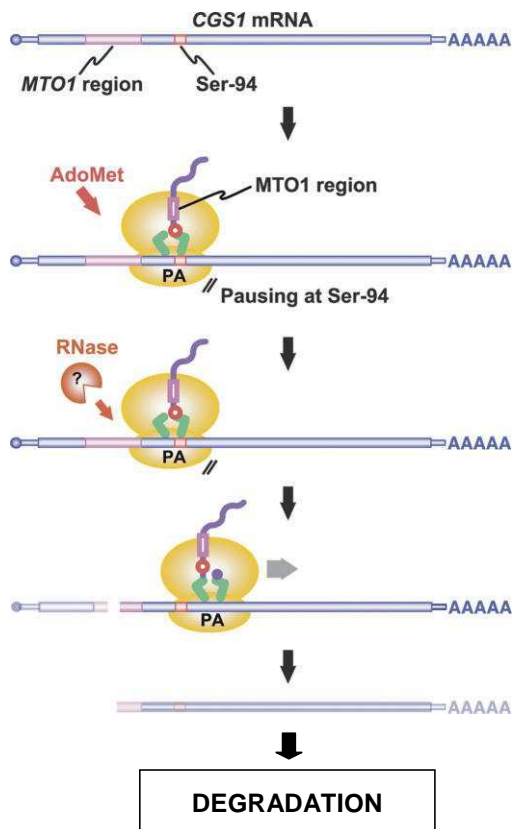
Différentes équipes ont constaté une diminution de l'activité CGS chez *Lemna* et chez l'orge lorsque les plantes sont cultivées en présence d'une source exogène de méthionine, suggérant ainsi un rétrocontrôle exercé sur la CGS par la méthionine ou par l'un de ses dérivés (Figure 18) (Thompson et al, 1982 ; Rognes et al, 1986). Cette régulation n'étant pas de nature allostérique puisque *in vitro* un ajout de méthionine n'a aucune d'incidence sur l'efficacité catalytique de la CGS, les auteurs en ont déduit que ce rétrocontrôle s'exerce sur la quantité de CGS dans le chloroplaste (Thompson et al, 1982).

Un autre mutant d'*Arabidopsis* accumulant d'importantes quantités de méthionine soluble (jusqu'à 40 fois plus que des plantes sauvages) a été isolé par Inaba et al (1994) et baptisé *mto1*. Chez les plants *mto1*, la quantité d'ARNm codant pour la CGS est deux à quatre fois plus élevée que chez les sauvages, ce qui se traduit par un niveau élevé de la protéine et une forte activité CGS (Chiba et al, 1999). La mutation *mto1* concerne une paire de base au niveau du premier exon du gène de la CGS (Chiba et al, 1999) (Figure 19). Or, si la séquence en acides aminés correspondant à l'exon 1 de la CGS présente globalement une faible conservation, la mutation responsable du phénotype de *mto1* réside dans une région d'une quarantaine d'acides aminés qui, elle, montre une très forte conservation entre les espèces végétales. Grâce à la caractérisation de différents allèles *mto1*, l'équipe de Naito a pu identifier dans cette région un stretch d'une dizaine d'acides aminés impliqué dans la régulation de la synthèse de méthionine : le domaine MTO1 (Ominato et al, 2002) (Figure 19).



**Figure 19 :** A) Représentation schématique du gène *CGS1* codant pour la CGS d'*Arabidopsis*. Les introns sont représentés par des traits, les exons par des rectangles blancs et les extrémités non traduites par des rectangles noirs. B) Alignement des séquences protéiques de la CGS d'*Arabidopsis*, de tomate, de tabac, de pois et de maïs au niveau de la région conservée MTO1. Les acides aminés conservés sont sur fond noir. La sérine 94 de la séquence d'*Arabidopsis* est en rouge.

Finalement, c'est en 2005 qu'a été proposé le modèle de régulation de la synthèse de méthionine par le domaine MTO1, cette régulation étant exercée non pas par la méthionine mais par la SAM (Onouchi et al, 2005) (Figure 20). En effet, chez des plantes sauvages, lorsque la concentration en SAM est élevée, la traduction de l'ARNm de la CGS marque une pause quand le codon correspondant à la sérine 94 de la CGS se trouve au contact du site A du ribosome. Le domaine MTO1 à peine traduit se situe alors dans le tunnel de sortie du ribosome et interagit avec lui pour bloquer l'élongation de la traduction. Une ribonucléase, encore non identifiée, clive l'ARNm en amont du ribosome puis la traduction reprend. L'ARNm clivé est par la suite dégradé ce qui conduit à une réduction de la quantité d'enzyme présente dans le chloroplaste et donc à une diminution de la synthèse *de novo* de méthionine. Chez les mutants *mto1*, ce système de régulation ne fonctionne pas en raison de la mutation de la région MTO1, ce qui explique l'importante accumulation de méthionine dans ces plantes.



**Figure 20: Modèle de la régulation post-transcriptionnelle de la synthèse de méthionine via le domaine MTO1.**

D'après Onouchi et al (2005).

### 5- Catabolisme de la méthionine.

Le catabolisme de la méthionine a largement été étudié dans le cadre de la fabrication de certains fromages comme le cheddar. En effet, ce type de fromage est très apprécié en raison de l'odeur particulière qu'il dégage et qui est due à l'émission de certains composés volatiles soufrés par les bactéries utilisées lors du processus de fabrication. Dias et Weimer (1998) ont démontré que ces bactéries, notamment certaines souches de *Lactococcus*, émettent des composés volatiles odorants suite à la dégradation de méthionine.

La première étape de ce catabolisme correspond à un clivage en  $\gamma$  de la méthionine produisant de la sorte de l'ammoniac, de l' $\alpha$ -cétobutyrate ( $\alpha$ -CB) et du méthanethiol ( $\text{CH}_3\text{-SH}$ ) (Dias et Weimer, 1998). Le  $\text{CH}_3\text{-SH}$  est un gaz qui, comme son nom l'indique, est porteur d'un atome de soufre et de ce fait dégage une odeur très particulière. L'enzyme catalysant cette réaction est la méthionine  $\gamma$ -lyase (MGL). Cette enzyme a été purifiée à partir de différents microorganismes,



son expression étant induite par addition de méthionine dans le milieu de culture (Ferchichi et al, 1986; Lockwood et al, 1991).

Schmidt et al (1985) ont analysé, par chromatographie en phase gazeuse, les composés volatiles émis par des disques de feuilles de citrouille incubés avec de la méthionine radiomarquée. Ils ont ainsi été les premiers à suggérer que les plantes avaient la capacité de dégrader la méthionine en dégageant du CH<sub>3</sub>-SH.

Des expériences de résonance magnétique nucléaire (RMN) du <sup>13</sup>C réalisées au laboratoire sur des cellules d'*Arabidopsis* supplémentées en méthionine radiomarquée ont confirmé l'existence de cette voie catabolique et permis d'élucider le devenir des produits issus de la première étape du catabolisme de la méthionine (Rébeillé et al, 2006). En effet, nous avons démontré que l' $\alpha$ -CB produit dans le cytosol est ensuite exporté vers le chloroplaste pour intégrer la voie de biosynthèse de l'isoleucine. Le recyclage du CH<sub>3</sub>-SH a également été mis en évidence lors de ce travail. Les profils RMN des cellules incubées avec de la méthionine marquée montrent que, lors de l'expérience, le marquage s'étend à la S-méthylcystéine (SMC). En effet, la majorité du CH<sub>3</sub>-SH issu de la dégradation de la méthionine est rejetée par les cellules sous forme d'un composé volatile alors qu'une petite partie, environ 25%, réagit avec de l'O-acétylsérine (une forme activée de la sérine) pour former de la SMC. Le rôle physiologique de ce composé reste encore à déterminer, mais il semblerait que la SMC soit rapidement transportée du cytosol vers la vacuole où elle servirait de forme de stockage du soufre et / ou de groupements méthyles.

Chez *Arabidopsis*, un seul gène codant pour une MGL a été identifié et la protéine correspondante a été caractérisée et localisée dans le cytosol. Il apparaît ainsi que la première étape du catabolisme de la méthionine chez les plantes est la même que celle mise en évidence chez certains microorganismes (Rébeillé et al, 2006). Il a également été démontré que, de la même façon que chez les microorganismes, l'expression de la MGL est induite par de fortes concentrations en méthionine. Des analyses menées par PCR quantitative suggèrent toutefois que cette augmentation de la concentration de MGL dans le cytosol ne serait pas due à une accumulation d'ARNm codant pour la MGL mais plutôt à un contrôle post-transcriptionnel de la quantité d'enzyme dans les cellules accumulant de la méthionine (Rébeillé et al, 2006).

## D- REGULATION DU METABOLISME C1 CHEZ LES PLANTES.

Le folate occupe une place centrale au sein de la cellule puisqu'il est à l'origine du métabolisme C1. Il paraît donc évident que la synthèse de ce cofacteur ainsi que sa distribution dans les différents organes de la plante sont finement régulés afin de coïncider avec les besoins de celle-ci tout au long de son développement.

### I- Distribution du folate au cours du développement.

Différentes études, menées principalement sur le pois, ont démontré que l'abondance du THF fluctue d'un tissu à l'autre dans la plante et varie également en fonction du stade de développement (Gambonnet et al, 2001 ; Jabrin et al, 2003).

Ainsi, il apparaît que les tissus les moins actifs du point de vue du métabolisme, à savoir les cotylédons, la tige et les racines, sont également ceux qui présentent les plus faibles concentrations en folates. La graine sèche en est également un exemple: la concentration en folates y est très faible, environ 0,35 nmol de folates par gramme de matière fraîche (g MF) (Gambonnet et al, 2001). Il a été démontré que dans tous ces tissus à faible teneur en folates, certaines enzymes de la voie de biosynthèse du THF sont également peu abondantes, notamment l'HPPK-DHPS (Jabrin et al, 2003 ; Rébeillé et al, 2006).

De plus, le fruit de la tomate, qui est un tissu quiescent, contient une faible teneur en folates qui diminue graduellement durant le murissement du fruit (Basset et al, 2004a). Cette réduction est associée à une diminution de l'expression des gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse du *p*-ABA et de la partie ptérine (Basset et al, 2002 ; Basset et al, 2004a et b).

La synthèse de folate et l'accumulation de ce cofacteur vitaminique sont *a contrario* très importantes dans les tissus à forte division cellulaire, ce qui s'explique, entre autres, par le fait que le THF participe à la synthèse des nucléotides. La germination constitue le passage d'un état de dormance à état de forte activité métabolique et à une reprise du cycle cellulaire. Ainsi, le processus de germination chez le pois est accompagné d'une forte augmentation de la teneur en folates ainsi que du niveau d'HPPK-DHPS, et ce principalement au niveau de l'embryon (Jabrin et al, 2003). Cette accumulation est due à l'initiation de la synthèse *de novo* du THF puisque des graines imbibées en présence d'asulam (inhibiteur de la DHPS, cf Figure 5) ne présentent pas d'accumulation de folates (Jabrin et al, 2003). De la même façon, les tissus méristématiques présentent une forte teneur en folates. Ainsi, dans la racine, qui est globalement pauvre en folate, ce cofacteur se trouve en concentration 5 fois plus importante au niveau du méristème racinaire que dans le reste de cet organe. Les cellules d'*Arabidopsis* en culture, qui ont la particularité de se diviser très rapidement, présentent également une forte teneur en folates (cf chapitres I, II et III). Les feuilles vertes matures sont les organes de la plante les plus riches en folates : le THF y est 3 fois plus abondant que dans n'importe quel autre organe de la plante (4 à 5 nmol /g MF). Cette forte teneur en folates est caractéristique des feuilles vertes puisque des feuilles de pois étiolées présentent une quantité de folates deux fois moindre (2,5 nmol/ g MF) (Jabrin et al, 2003).

Chaque dérivé du THF participe à un nombre restreint de réactions du métabolisme C1 qui lui sont propres. De plus, la demande en unités C1 diffère d'un compartiment cellulaire à un autre en fonction des réactions qui y ont lieu. Ainsi, dans les feuilles vertes, la mitochondrie est le compartiment cellulaire présentant la plus forte concentration en folates: 1800 pmol de folate par mg de protéines (Jabrin et al, 2003). Cette concentration élevée peut se justifier par le fait que

les dernières étapes de la synthèse *de novo* du THF ont lieu dans la mitochondrie. Cette abondance en folates peut également s'expliquer par la présence dans la mitochondrie de la SHMT et de la GDC, enzymes clés de la photorespiration, qui s'accumulent dans les mitochondries de feuilles vertes jusqu'à atteindre 40% des protéines solubles de ce compartiment. Il faut cependant garder à l'esprit que le compartiment mitochondrial ne représente qu'une petite partie du volume et du protéome cellulaire (4 à 6% des protéines solubles totales de la feuille). Le folate mitochondrial ne représente ainsi que 30% du pool total de folate. Les chloroplastes renferment 10% du folate cellulaire, la vacuole en contient 20 % et les 40% restant se trouvent dans la fraction cytosolique (Rébeillé et al, 2007).

Dans les organites, le THF se retrouve principalement sous forme polyglutamylée, mais l'équilibre entre les différents dérivés varie en fonction du compartiment. En effet, la mitochondrie renferme principalement du 5-CHO-THF, dérivé qui ne participe à aucune réaction du métabolisme C1, ainsi que du THF non chargé. La présence de ce dernier vient probablement du fait que la synthèse *de novo* du THF se situe dans la mitochondrie (Orsomando et al, 2005). Les formes majoritaires de folate dans le chloroplaste sont le 10-CHO-THF et le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF. Cet organite contient un peu de 5-CH<sub>3</sub>-THF (Orsomando et al, 2005). Cette composition du pool de folates chloroplastique s'explique par le rôle de cet organite dans le métabolisme C1, à savoir la synthèse des nucléotides qui fait appel au 10-CHO-THF et au 5,10-CH<sub>2</sub>-THF mais aussi la synthèse *de novo* de méthionine avec l'utilisation de 5-CH<sub>3</sub>-THF comme cofacteur de la méthionine synthase.

## II- Perturbation du métabolisme C1 chez les plantes.

La littérature est assez pauvre en données concernant la régulation du métabolisme C1 chez les plantes. En effet, en raison du nombre de réactions de transfert d'unités C1 qui ont lieu dans la cellule, la régulation du métabolisme C1 constitue un vaste champ d'investigation.

Néanmoins l'équipe de John King a réalisé différentes études concernant la régulation de la synthèse de sérine chez *Arabidopsis*. Il a en effet été suggéré que les fortes concentrations en folates mesurées dans les mitochondries des tissus foliaires reflètent les besoins de la plante pour alimenter l'activité du complexe GDC / SHMT (Prabhu et al, 1998). Les auteurs ont donc employé deux inhibiteurs de la synthèse du folate, le MTX et le sulfanilamide, puis ont, par RMN du <sup>13</sup>C, suivi sur plantes entières, l'évolution des pools de glycine et de sérine en réponse à cette perturbation (Prabhu et al, 1998).

Lors de cette étude, les plants d'*Arabidopsis* traités simultanément au MTX et au sulfanilamide présentent, dès 24 heures d'expérimentation, une diminution de la synthèse de sérine de l'ordre de 50 %. Il faut cependant attendre 96 heures de traitement pour que cette synthèse de sérine ne soit plus détectable, ce qui tend à prouver la robustesse du pool mitochondrial de THF. Le pool de glycine ne montre pas d'évolution importante tout au long du traitement. Les auteurs ont également démontré que si le MTX inhibe de façon importante le flux de carbone à travers le complexe GDC/ SHMT, le sulfanilamide a, lui, un effet beaucoup plus mesuré. De plus, l'inhibition de la synthèse de sérine par le MTX seul est équivalente à celle induite par la combinaison MTX / sulfanilamide (Prabhu et al, 1998).

La supplémentation des plantes traitées au MTX par du 5-CHO-THF permet la restauration de la synthèse de sérine. L'inhibition de cette synthèse lors d'un traitement au MTX est donc due à une diminution de la quantité de THF *via* l'inhibition de la DHFR et non à une inhibition directe du complexe GDC/ SHMT (Prabhu et al, 1998).

Goyer et al (2005) ont également étudié le rôle du 5-CHO-THF sur le métabolisme C1. En effet, ces auteurs ont pu mettre en évidence que des mutants d'*Arabidopsis* KO pour le gène de la 5-FCL accumulent deux fois plus de 5-CHO-THF dans les feuilles que des plants sauvages. Néanmoins ces plants mutants ne présentent pas de phénotype très marqué si ce n'est un léger retard de croissance. Des dosages de folates réalisés sur ces plants ont également démontré qu'en plus d'accumuler de grandes quantités de 5-CHO-THF les plants mutants accumulent également plus de 10-CHO-THF et de 5,10-CH<sup>+</sup>-THF (ces deux composés ne sont cependant pas séparables par la technique d'analyse employée ici).

### III - Objectifs de mon travail de thèse.

Comme nous avons pu le constater précédemment, la littérature concernant la régulation du métabolisme C1 chez les plantes reste relativement succincte. En effet, au début de mon travail de thèse deux questions majeures restaient en suspend :

- Comment l'homéostasie en folates, c'est-à-dire la quantité intracellulaire mais également l'équilibre entre les différents dérivés du cofacteur, s'adapte aux besoins fluctuants de la cellule végétale ?
- Comment est contrôlée la distribution des unités C1 vers les différentes voies anaboliques folates-dépendantes ?

Lorsque j'ai intégré le Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, l'approche utilisée par l'équipe "folate et métabolisme C1" pour répondre à ces questions consistait à perturber le métabolisme C1 chez *Arabidopsis* pour ensuite en analyser les conséquences.

Ainsi, en supplémentant en méthionine des cellules d'*Arabidopsis* et donc en perturbant leurs besoins en unités C1, Samuel Jabrin, lors de sa thèse, a pu observer une diminution significative de la teneur intracellulaire en folates. Les dosages de folates n'ont cependant pas révélé de perturbation de l'équilibre entre les différents dérivés de THF. L'expérience "inverse" a également été réalisée : afin d'augmenter la demande en unités C1, Samuel a supplémenté des cellules d'*Arabidopsis* en homocystéine, précurseur de la méthionine. Les dosages métaboliques ont alors montré une augmentation de la teneur en folates, encore une fois sans perturbation de l'équilibre entre les différents dérivés. Dans chacun des deux cas il n'a pas constaté de modification de l'expression de 3 des 10 enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du folate. Ces travaux, qui n'ont pas été poussés plus en avant, mettent en évidence l'existence d'une régulation qui permet à la teneur en folate de s'adapter aux besoins en unités C1.

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous nous sommes employés à répondre à la question de la distribution des unités C1 à travers les différentes voies du métabolisme C1. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie similaire à celle mise en place par l'équipe de John King (Prabhu et al, 1996 et 1998 ; Li et al, 2003). En effet, nous avons choisi de perturber le métabolisme C1 en ciblant directement la synthèse du folate à l'aide d'antifolates. A l'origine, ce travail a été initié par Samuel Jabrin au cours de sa thèse (2000-2004). Ainsi, en inhibant la synthèse de THF chez *Arabidopsis*, nous avons pu étudier, par l'utilisation de puces à ADN, la réponse globale du métabolisme C1 au cours de l'instauration d'un déficit en folates. Cette étude nous a permis de démontrer que, lors d'une diminution du pool de folates, la cellule végétale établit de nouvelles priorités au sein du métabolisme C1 en réorientant le flux d'unités C1 vers la synthèse des nucléotides au détriment des réactions de méthylation. Cette étude a également mis en évidence un gène qui est potentiellement un élément régulateur clé du métabolisme du folate. La

caractérisation fonctionnelle de ce gène est actuellement en cours. Nous avons également pu confirmer la diminution des méthylations cellulaires lors d'un déficit en folates en étudiant plus particulièrement la réaction catalysée par la Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase, enzyme impliquée dans la synthèse des chlorophylles. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence le lien qui existe entre le statut cellulaire en folates et la capacité à effectuer des méthylations cellulaires lors d'un processus aussi essentiel que la synthèse des chlorophylles. Outre les réponses transcriptionnelle et métabolique précédentes, le métabolisme du folate présente un niveau de régulation supplémentaire. En effet, le 3<sup>ème</sup> chapitre des résultats de ce manuscrit est consacré à la découverte et à l'étude de la régulation post-traductionnelle d'une enzyme de la voie de biosynthèse de méthionine, la cystathionine  $\gamma$ -synthase. Nous avons effectivement démontré que cette enzyme subit un clivage de son extrémité N-terminale lorsque des cellules d'*Arabidopsis* sont carencées en folates, ce qui leur permet alors de recouvrer un niveau de méthionine équivalent à celui de cellules témoins.

Ce travail aura donc permis de mettre en évidence différents mécanismes qui permettent à la cellule végétale de répondre à une perturbation de l'homéostasie en folates. Ainsi, nous avons démontré qu'il existe chez *Arabidopsis* au moins trois niveaux de réponse à un déficit en folates : transcriptionnel, métabolique et post-traductionnel.

## **RESULTATS**

---



# CHAPITRE I

---

## **Etude transcriptomique et métabolique de la réponse de cellules d'*Arabidopsis thaliana* à un déficit en folates induit par le méthotrexate**

**A Genome-Wide and Metabolic Analysis Determined the Adaptive Response of Arabidopsis Cells to Folate Depletion Induced by Methotrexate**

**Plant Physiology. 2008 Dec;148(4):2083-95**

Karen Loizeau, Veerle De Brouwer, Bernadette Gambonnet, Agnès Yu, Jean-Pierre Renou, Dominique Van Der Straeten, Willy E. Lambert, Fabrice Rébeillé and Stéphane Ravanel





## Chapitre I

## Etude transcriptomique et métabolique de la réponse de cellules d'*Arabidopsis thaliana* à un déficit en folates induit par le méthotrexate

Afin d'étudier la réponse précoce de cellules d'*Arabidopsis* en culture à une situation de déficit en folates, nous avons employé une stratégie qui consiste à inhiber la synthèse *de novo* de THF avec du méthotrexate (MTX). Les conséquences de cette perturbation ont été analysées au niveau métabolique et transcriptomique au cours d'une cinétique couvrant 24 heures de traitement.

Suite au traitement au MTX, le contenu en folates des cellules a été analysé par chromatographie liquide couplée à deux spectromètres de masse en tandem (collaboration avec le Laboratoire de Toxicologie de l'Université de Gand). Cette analyse nous a permis de constater que le traitement mis en œuvre permet de réduire progressivement et fortement la teneur en folates des cellules (jusqu'à 77 % de diminution après 24 h). L'utilisation du MTX a également entraîné des changements importants dans la proportion des dérivés du THF. En effet, alors que le CH<sub>3</sub>-THF est le dérivé majoritaire au sein du pool de folates dans des conditions physiologiques, ce composé devient minoritaire dans les cellules traitées au MTX (Figure 1).

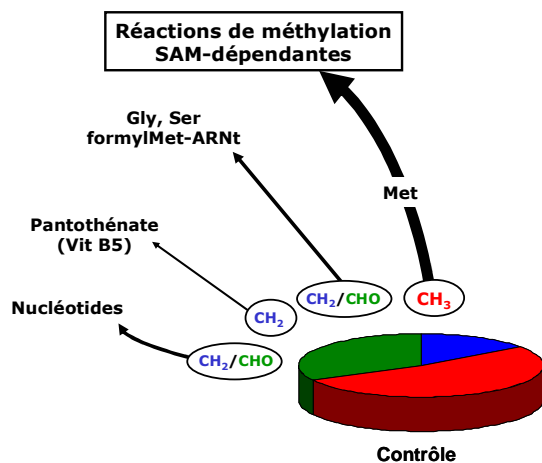
Le transcriptome des cellules déficientes en folates a été analysé à l'aide de puces à ADN CATMA "full-genome". Cette étude transcriptomique globale a permis de mettre en évidence plus de 2600 gènes présentant une différence d'expression significative suite au traitement. En nous appuyant sur la base de données MIPS (Munich Information center for Protein Sequences) nous avons réalisé une classification fonctionnelle de ces 2600 gènes différentiellement exprimés, ce qui nous a permis de mettre en évidence les grandes fonctions biologiques présentant une réponse marquée au déficit en folates. Nous avons notamment observé que de nombreux gènes impliqués dans des mécanismes de détoxification de composés xénobiotiques sont induits suite au traitement (cytochromes P450, glutathione *S*-transférases, ABC transporteurs...). Cette réponse est attribuée, principalement voire exclusivement, à la nature chimique du MTX utilisé pour induire l'épuisement du pool de folates.

Le cycle cellulaire est également affecté par la diminution du pool de folates puisque plusieurs gènes codant pour des protéines permettant le passage de la phase G2 à la phase M (CDK, cyclines) sont réprimés. Nous avons confirmé ce blocage du cycle cellulaire en constatant l'arrêt de la division des cellules traitées au MTX. Les cellules déficientes en folates présentent également une diminution de la respiration et de la photosynthèse, ce qui vient corroborer la répression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique mise en évidence par l'analyse transcriptomique. Ces deux éléments, la répression du cycle cellulaire et l'altération du métabolisme énergétique, sont vraisemblablement liés à un déficit en nucléotides provoqué par la limitation en folates : dans le cas du cycle cellulaire, il s'agirait d'un déficit en purines et thymidylate alors que dans le cas du métabolisme énergétique, il s'agirait d'un déficit en nucléotides "énergétiques" (ATP, GTP).

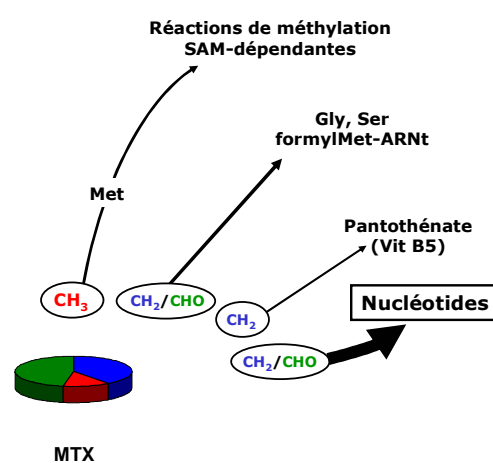
Dans les cellules animales carencées en folates, les gènes codant les systèmes d'import sont surexprimés et ceux codant les systèmes d'efflux sont réprimés afin de favoriser l'entrée puis la rétention du cofacteur vitaminique dans la cellule (Ifergan et Assaraf, 2008). Dans les cellules d'*Arabidopsis*, il apparaît, de façon surprenante, que les gènes impliqués dans la synthèse, le transport et la dégradation du THF ne présentent pas de modification de leur expression lors de la carence en folates. Ainsi, ces cellules ne semblent pas mettre en place (du moins au niveau transcriptionnel) de processus de compensation de la diminution du pool de folates, si ce n'est une surexpression du gène codant une FPGS, enzyme qui permettrait à la cellule de retenir et de stabiliser les dérivés du THF.

Au niveau du métabolisme C1, la réponse principale des cellules d'*Arabidopsis* au cours de l'établissement du déficit en folates concerne la composition en dérivés du THF et non l'abondance de ce cofacteur vitaminique. Ainsi, les changements dans la distribution des dérivés du THF sont associés à l'induction de plusieurs gènes codants pour des enzymes impliquées dans l'interconversion des dérivés du THF dans les plastes. Ces changements ont pour conséquence une réorientation du flux d'unités C1 vers la synthèse des nucléotides au détriment des réactions de méthylations (Figure 1). En effet, la diminution importante du pool de CH<sub>3</sub>-THF, la forte perturbation de l'homéostasie des intermédiaires métaboliques du cycle des méthyles ainsi que l'absence de régulation transcriptionnelle des gènes codant la centaine de méthyltransférases cellulaires suggèrent une très forte perturbation des méthylations cellulaires (cf chapitre II). Ainsi, en réponse à une carence en folate, les cellules d'*Arabidopsis* établissent de nouvelles priorités au sein des réactions du métabolisme C1 en favorisant l'alimentation en unités C1 des voies qui mènent à la synthèse des nucléotides, probablement dans le but de préserver le métabolisme énergétique ainsi que la synthèse et la réparation de l'ADN.

Situation physiologique



Cellules déficientes



**Figure 1** : Distribution et utilisation des unités C1 en réponse à un déficit en folates induit par le MTX.

La quantité et la distribution des folates chargés en unités C1 sont illustrées par les graphiques. Le 5-CH<sub>3</sub>-THF est indiqué en rouge, le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF en bleu et le 10-CHO-THF en vert. L'intensité des flèches, basée sur la distribution des dérivés du THF et l'expression des gènes, est représentative du flux d'unités C1 vers les différentes voies utilisatrices.

# A Genome-Wide and Metabolic Analysis Determined the Adaptive Response of Arabidopsis Cells to Folate Depletion Induced by Methotrexate<sup>1[W]</sup>

Karen Loizeau, Veerle De Brouwer, Bernadette Gambonnet, Agnès Yu, Jean-Pierre Renou, Dominique Van Der Straeten, Willy E. Lambert, Fabrice Rébeillé, and Stéphane Ravel\*<sup>\*</sup>

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, UMR5168 CNRS-CEA-INRA-Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, F-38054 Grenoble cedex 9, France (K.L., B.G., F.R., S.R.); Laboratory of Toxicology (V.D.B., W.E.L.), and Unit Plant Hormone Signaling and Bio-imaging, Department of Molecular Genetics (D.V.D.S.), Ghent University, B-9000 Ghent, Belgium; and UMR INRA1165 CNRS8114 UEVE, Unité de Recherche en Génomique Végétale, CP5708, F-91057 Evry, France (A.Y., J.-P.R.)

Control of folate homeostasis is essential to sustain the demand for one-carbon (C1) units that are necessary for major biological functions, including nucleotide synthesis and methylation reactions. In this study, we analyzed the genome-wide and metabolic adaptive response of Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) cells to folate depletion induced by the antifolate methotrexate. Drug treatment induced a response typical to xenobiotic stress and important changes in folate content and composition. This resulted in a reduction of cell division and primary energy metabolism that was likely associated with perturbation of nucleotide homeostasis. Through a modification of serine metabolism, folate depletion also induced *O*-acetylserine accumulation and mimicked sulfur deficiency response. The major adaptive response to folate limitation concerned the composition of the folate pool rather than the intracellular level of cofactors. Thus, no significant change in the expression of genes involved in cofactor synthesis, degradation, or trafficking was observed. However, changes in the distribution of C1 derivative pools and increased expression levels for transcripts coding enzymes manipulating C1 moieties in plastids suggested a reorientation of C1 units toward the synthesis of purine and thymidylate. Also, no genomic or metabolic adaptation was built up to counterbalance the major impairment of the methyl index, which controls the efficiency of methylation reactions in the cell. Together, these data suggested that the metabolic priority of Arabidopsis cells in response to folate limitation was to shuttle the available folate derivatives to the synthesis of nucleotides at the expense of methylation reactions.

One-carbon (C1) metabolism refers to a complex network in which C1 units carried by folate cofactors are used for essential biosynthetic and regulatory functions. Cellular tetrahydrofolate (THF) derivatives, collectively termed folate(s), differ in the location and oxidation level of the C1 unit they carry and by the length of their (poly)Glu side chain. The 10-formyl derivative of THF is involved in purine and 10-formylmethionine-tRNA synthesis, 5,10-methylene-THF is required for thymidylate and pantothenate synthesis and for Gly to Ser conversion, and 5-methyl-THF

is the methyl donor for the synthesis of Met (Fig. 1; Hanson and Roje, 2001). Met is incorporated into protein or converted to *S*-adenosylmethionine (Ado-Met), the universal methyl donor that is involved in dozens methyltransferase reactions and in the biogenesis of ethylene, polyamines, biotin, and nicotianamine (Roje, 2006). C1 metabolism in plants displays unique features as compared to other organisms, in particular regarding its multiple subcellular compartmentation (Fig. 1). Also, plants are able to synthesize THF de novo through a complex biosynthetic route comprising 10 steps located in three subcellular compartments (plastids, cytosol, and mitochondria; Rébeillé et al., 2006).

During plant development, the enzymatic capacity for THF synthesis, the pool of folates, and the demands for C1 units vary importantly (Gambonnet et al., 2001; Basset et al., 2002, 2004a, 2004b; Jabrin et al., 2003). Little is known, however, about how folate homeostasis is controlled to match the supply of C1 units with fluctuating demand and how C1 units are accurately distributed between different anabolic routes. To gain insights into the regulatory processes governing this network, several groups analyzed the

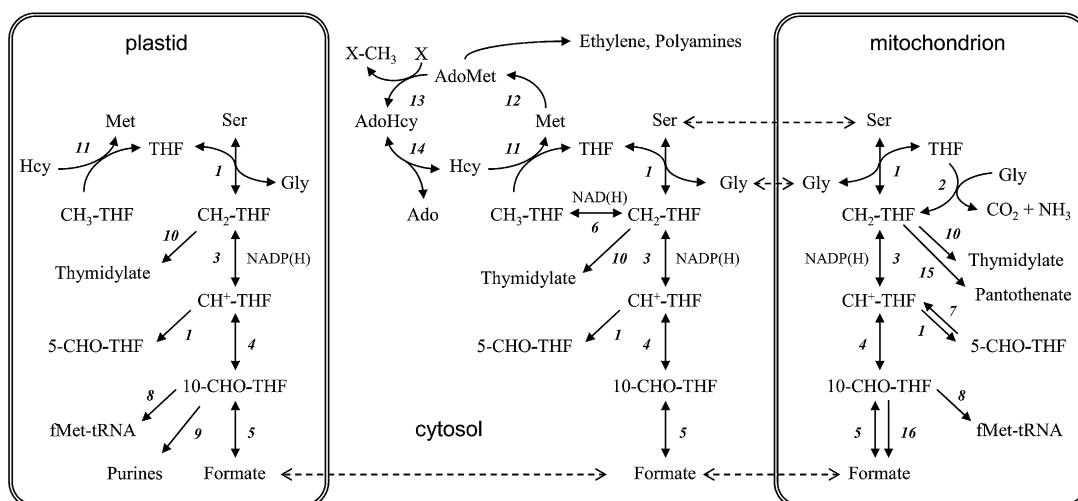
<sup>1</sup> This work was supported by the French Ministry of Research (a Ph.D. fellowship to K.L.). The folate analysis was supported by the Institute for the Promotion of Innovation through Science and Technology in Flanders (IWT Vlaanderen; grant no. GOA 1251204 [Bijzonder Onderzoeksfonds, UGent] to D.V.D.S. and W.L. and a bursary to V.D.B.).

\* Corresponding author; e-mail sravel@cea.fr

The author responsible for the distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Stéphane Ravel (sravel@cea.fr).

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.130336](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.130336)



**Figure 1.** Overview of C1 metabolism and its compartmentation in plant cells. 1, SHMT; 2, Gly decarboxylase; 3, 5,10-methylene-THF dehydrogenase; 4, 5,10-methenyl-THF cyclohydrolase; 5, FTHFS; 6, 5,10-methylene-THF reductase; 7, 5-formyl-THF cycloligase; 8, methionyl-tRNA formyltransferase; 9, glycinamide ribonucleotide transformylase and aminoimidazole carboxamide ribonucleide transformylase; 10, thymidylate synthase; 11, Met synthase; 12, AdoMet synthetase; 13, AdoMet-dependent methyltransferase; 14, AdoHcy hydrolase; 15, ketopantoate hydroxymethyltransferase; 16, 10-formyl-THF deformylase. Ado, adenosine; THF and its derivatives:  $\text{CH}_3$ - (methyl),  $\text{CH}_2$ - (methylene),  $\text{CH}^+$ - (methenyl), 5-CHO-, and 10-CHO- (formyl).

consequences of perturbation of the folate pool on C1 metabolism. By exposing *Arabidopsis thaliana* plants to folate antagonists, Prabhu et al. (1998) determined that a continuous supply of folates was essential to maintain high rates of Ser synthesis during the photorespiratory process. Also, plant cell cultures treated with the folate analog methotrexate (MTX) displayed an important inhibition of their growth (Wu et al., 1993), thus emphasizing the crucial role of folates in nucleotide synthesis and cell division. Last, folate limitation in *Arabidopsis* cells was associated with important perturbation of the activated methyl cycle, which corresponds to a recycling of Met and AdoMet following methylation reactions (Loizeau et al., 2007). Upon 5-methyl-THF depletion, a delayed restoration of Met and AdoMet homeostasis was observed and correlated with a proteolytic cleavage of the N terminus of the first enzyme involved in de novo Met synthesis (Loizeau et al., 2007). Processing of this enzyme was specifically associated with perturbation of the folate pool, thus demonstrating that a folate-dependent anabolic route can adapt to folate depletion through a posttranslational regulatory process. Drug-induced folate starvation in *Arabidopsis* cells was also associated with a significant modification of folate composition (distribution of C1 derivatives), suggesting an adaptive response to favor a preferential shuttling of the flux of C1 units to the synthesis of nucleotides over the synthesis of Met (Loizeau et al., 2007).

The aim of this genome-wide and metabolic study was to gain insight into the regulatory process leading to the adaptation of cell physiology, and more partic-

ularly of C1 metabolism, upon perturbation of folate homeostasis. We showed that folate limitation due to MTX application was responsible for important metabolic disturbance, including stress response, impairment in cell division, and reduction of energy metabolism. Also, a metabolic priority of *Arabidopsis* cells was to shuttle the available C1 derivatives to the synthesis of nucleotides at the expense of AdoMet synthesis and methylation reactions.

## RESULTS AND DISCUSSION

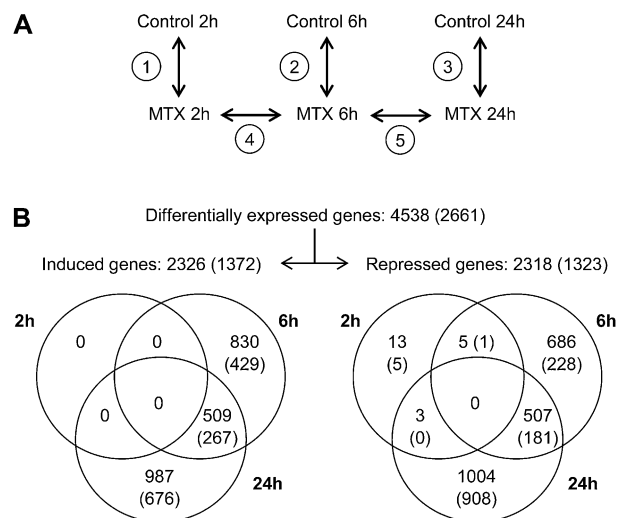
In this study, we used the antifolate MTX to analyze the genome-wide and metabolic consequences of folate depletion in *Arabidopsis* cells. MTX is an analog of dihydrofolate that primarily acts on dihydrofolate reductase (DHFR), an enzyme involved in the de novo synthesis of THF and in the regeneration of reduced folate coenzymes from oxidized dihydrofolate species. Previous studies have shown that MTX is useful to manipulate folate pools in plants (Wu et al., 1993; Prabhu et al., 1998; Loizeau et al., 2007). In our study, MTX was used at 100  $\mu\text{M}$  to induce rapid perturbation of folate homeostasis in *Arabidopsis* cells, and the dynamics of global transcriptomic changes was followed 2, 6, and 24 h following drug addition to the culture medium. Foliates were determined by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and, taking into account experimental bias (De Brouwer et al., 2007), derivatives were grouped into five categories, namely 5-methyl-THF, 5-formyl-THF, THF plus 5,10-methylene-THF, 10-formyl-THF plus 5,10-methenyl-THF, and folic

acid. Control Arabidopsis cells contained an average of 12 nmol folates/g of fresh weight (FW) all along the examined period (Supplemental Table S1). In treated cells, MTX uptake was rapid, and the intracellular pool reached a plateau value at about 10 nmol/g FW after 6 h of treatment. Upon MTX treatment, the overall pool of folate decreased by 22%, 56%, and 77% after 2, 6, and 24 h of exposure to the drug, respectively (Supplemental Table S1). As previously described by Loizeau et al. (2007), this treatment also induced an imbalance in C1-substituted cofactors, the pool of 5-methyl-THF being the most severely reduced, whereas other derivatives decreased less rapidly.

### Effects of MTX on Genome-Wide Expression in Arabidopsis Cells

To follow changes in gene expression over the time course of exposure to MTX, we directly compared control and MTX-treated cells at 2, 6, and 24 h (Fig. 2A, comparisons 1–3) using the Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray (CATMA) chips. Statistical analysis using a  $P$ -value cutoff of  $<0.05$  after Bonferroni correction (Gagnot et al., 2008) revealed 4,538 genes displaying significant differential expression at some point during drug treatment. Thus, 20% of the 22,089 Arabidopsis nuclear genes represented on the CATMA array displayed changes in mRNA levels in response to MTX treatment. The dynamics of genome-wide response was confirmed through direct comparisons of MTX-treated cells at 2, 6, and 24 h (Fig. 2A, comparisons 4–5). Differentially expressed genes showed an equal distribution between up- and down-regulated groups (2,326 and 2,318 genes, respectively, Fig. 2B). In addition, 106 genes were shared by these two categories as they displayed induction followed by repression, or vice versa, during the time course analysis. The expression profiles of 12 selected genes were analyzed by real-time quantitative RT-PCR (qPCR) and allowed to validate the array experiments (Supplemental Table S2).

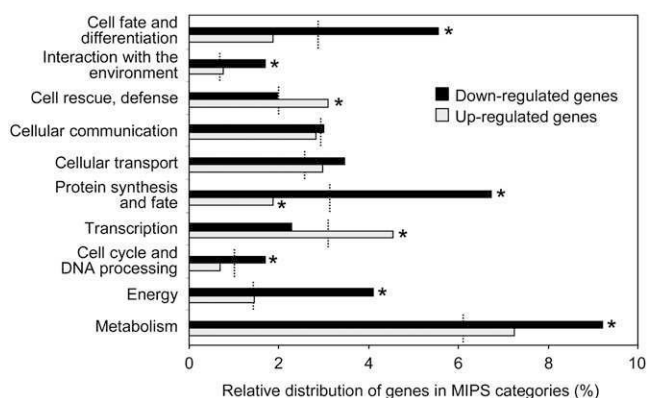
To focus our study on highly responsive transcripts, we have selected differentially expressed genes for which  $\log_2(\text{ratio})$  was  $>1$  or  $<-1$  (corresponding to 2-fold changes). The resulting 2,661 MTX-responsive genes were classified according to their temporal expression, and we could define two principal sets of genes corresponding to an early (6 h) and a late (24 h) response to MTX treatment (Fig. 2B). After 2 h of exposure to MTX, cellular changes due to drug incorporation within cells and the associated modest depletion of the folate pool (22% as compared to control cells) were not sufficient to induce a significant transcriptional response of Arabidopsis cells. The early response to MTX treatment comprised 1,106 highly regulated genes, of which 657 displayed only transient differential expression at 6 h. For 448 genes, the differential expression observed in the early phase of the response to MTX was maintained in the late period. Both the transient and persistent sets of early



**Figure 2.** Experimental design for CATMA transcript profiling and distribution of MTX-responsive genes over the time course analysis. **A**, Schematic representation of the experimental procedure used for transcript profiling of the Arabidopsis cell response to MTX. Five comparisons (1–5) of MTX-treated cells and corresponding controls were performed at three time points (see “Materials and Methods” for details). **B**, Number of genes regulated in response to MTX treatment. Differentially expressed genes were selected by statistical analysis after Bonferroni correction ( $P$ -value cutoff of 0.05). Numbers in parenthesis correspond to highly regulated genes, i.e. genes for which the  $\log_2$  (ratio) value was  $>1$  or  $<-1$  (2-fold changes).

regulated genes were characterized by a high proportion of up-regulated transcripts (63%). Lastly, genes for whom the differential expression was specific to the late response to MTX accounted for 60% of highly responsive transcripts. Particularly, 908 out of 1,323 down-regulated genes (i.e. 69%) were typical of a late response (Fig. 2B).

To gain insight into the biological processes in which the highly differentially expressed genes are involved, we performed functional categorization based on the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS) database (Fig. 3; Ruepp et al., 2004). In addition to the large number of genes with no clear function (74% of the Arabidopsis genes and 66% of the MTX-responsive genes), the principal bias of the MIPS classification resides in the important variation in the number of genes in each category. Thus, to highlight biological processes that are significantly affected by the MTX treatment, we compared the proportion (in percent), but not the number, of MTX highly responsive genes assigned in each category to the relative distribution of all the Arabidopsis annotated genes in the different categories (Fig. 3). Using these criteria, the most significantly modified categories among the MTX-repressed genes were metabolism, energy, protein synthesis, cell fate and differentiation, interaction with the environment, and cell cycle. Figure 3 shows that for MTX-induced genes, the MIPS categories



**Figure 3.** Functional categorization of MTX-regulated genes. Highly responsive genes were separated into up-regulated (gray bars) and down-regulated (black bars) sets and classified into functional categories using the MIPS interface (Ruepp et al., 2004). The proportion (in percent) of MTX-responsive genes identified in each category is indicated on the x axis. Dotted lines indicate the distribution (percent) of all the Arabidopsis genes in each MIPS category. Asterisks indicate that the distribution of MTX-responsive genes is significantly different from that of Arabidopsis genes using a chi-square test with an  $\alpha$  risk of  $P < 0.01$ . Genes of unknown function, which represent 74% of the Arabidopsis genes and 66% of the MTX-responsive genes, were excluded from the figure for clarity.

principally affected were transcription and cell rescue, whereas protein synthesis was the lowest represented functional group. The function of selected groups of MTX-regulated genes will be analyzed in detail in the next paragraphs.

### MTX Treatment Is Associated with a Broad Slowdown of Primary Metabolic and Cellular Processes

In agreement with the antiproliferative properties of MTX, we observed that growth of Arabidopsis cells supplied with the drug was markedly reduced (Supplemental Fig. S1). Cell viability was not affected by MTX, thus indicating that the treatment did not trigger cell death during the examined period of culture. Thus, growth inhibition upon MTX treatment illustrated the crucial role of folates in nucleotide synthesis, DNA synthesis, and cell division. It was not surprising, therefore, to observe that MTX-repressed genes were highly represented in the “cell cycle and DNA processing” MIPS functional category (Fig. 3). More specifically, it appeared that crucial genes involved in the control of the G<sub>2</sub>/M transition of the cell cycle (Francis, 2007) were down-regulated in MTX-treated cells, mainly in the late phase of the response. Thus, the cyclin-dependent protein kinase B CDKB2, for which the activity normally peaks in mid-to-late G<sub>2</sub>, the CKS1 and CKS2 proteins that interact with CDKs, and three cyclins A/B, substrates of CDKs, were down-regulated in response to MTX treatment (Supplemental Table S3). A similar behavior was observed

for CDC25, which dephosphorylates CDKA/B to allow the fully active kinase to drive cells into mitosis (Francis, 2007). Also, the down-regulation of seven tubulin  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain coding genes and of the KIS tubulin-folding cofactor gene suggested that the microtubule cytoskeleton, which forms unique arrays during cell division, was markedly affected in MTX-treated cells (Supplemental Table S3). Together, these data suggested that folate depletion probably resulted in perturbation of nucleotide homeostasis and abnormal DNA synthesis during the S phase and induced a subsequent blockage of cell division through a down-regulation of key genes of the G<sub>2</sub>/M check-point.

As illustrated in Figure 3, the impairment in cell division was accompanied by an important repression of genes involved in protein synthesis and metabolism. Thus, 44 genes coding ribosomal proteins, which are structural constituents of ribosome 40S and 60S, were down-regulated in the early and late phases of MTX response. An important decrease in cellular energy metabolism was also a characteristic of the response induced by MTX. Measurements of respiration rates in control and treated cells indicated an approximately 40% reduction after 24 h of exposure to the antifolate (Supplemental Fig. S1). Photosynthesis, which is not elevated in Arabidopsis cells grown under mixotrophic conditions, was also reduced by about 50% in MTX-treated cells as compared to controls after 24 h of treatment. These measurements fit well with the transcriptomic data showing that key genes of both respiration (e.g. subunits of mitochondrial inner membrane complexes) and photosynthesis (e.g. small subunit of Rubisco and subunits of PSI and PSII) were down-regulated in the late phase of exposure to MTX (Supplemental Fig. S2). Several genes involved in photorespiration, a process that is tightly associated with photosynthesis in C<sub>3</sub> plants and depends on folate-dependent steps located in mitochondria, were also down-regulated in response to MTX treatment. These genes encode the principal mitochondrial isoform of Ser hydroxymethyltransferase (SHMT; Voll et al., 2006) and the H, P, and T subunits of the Gly decarboxylase complex (Douce et al., 2001).

In conclusion, the effects of MTX treatment resulted in a broad slowdown of essential physiological functions, including cell division and primary energy metabolism. These changes could be due, to some extent, to perturbations of NTP and dNTP pools following MTX treatment. Indeed, in addition to their essential role as building blocks for nucleic acid synthesis, purine and pyrimidine are also required for energy metabolism and participate in many important biochemical processes (Zrenner et al., 2006). Folate depletion, through the inhibition of both purine and pyrimidine synthesis (Fig. 1), was likely responsible for the observed physiological and genome-wide response of Arabidopsis cells to MTX treatment. To support these assumptions, Kidd et al. (1982) have shown that pea (*Pisum sativum*) seedlings treated with the antifolate asulam accumulated two intermediates

of purine biosynthesis, thus indicating that folate deficiency was associated with an impairment of nucleotide synthesis. Also, growth inhibition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) protoplast-derived cells induced by MTX was prevented by a mixture of Met, adenine, and thymidine (Poll et al., 1984).

### MTX Induces a Stress Response Characteristic to Xenobiotic Treatments

According to the MIPS catalogue, 66 putative transcription factors belonging to various families were found to be up-regulated in response to MTX treatment (i.e. 4.5% of the up-regulated genes; Fig. 3). A search in the plant transcription factor database PlantTFDB (Guo et al., 2008) enlarged this list to 146 members. Among them, 86 genes were associated with the early response and 13 displayed  $\log_2(\text{ratio})$  higher than 3 (8-fold induction) after 6 h of exposure to MTX. To analyze whether these genes were specifically associated with MTX treatment and/or perturbation of folate homeostasis, we analyzed their expression profiles using the Genevestigator database and software (Zimmermann et al., 2004). The 13 selected genes were found to be up-regulated to elevated levels by at least one abiotic and biotic stress. Examination of other up-regulated genes coding putative transcription factors suggested that most of these changes were not characteristic for folate depletion but most likely resulted from a stress response induced by the MTX drug. This assumption was strengthened by the observation that MTX-induced genes were highly represented in the MIPS functional category "cell rescue and defense" (Fig. 3). These genes related to stress response include, for example (Supplemental Table S3), the *Aox1a* and *Aox1d* genes coding alternative oxidases (Clifton et al., 2006) and genes involved in the synthesis of ethylene and polyamines, two metabolites derived from AdoMet (Fig. 1) and involved in plant stress responses (Fujita et al., 2006; Groppa and Benavides, 2008). Other stress-related genes could be associated more specifically to detoxification of xenobiotics by plants (Coleman et al., 1997). They include several genes coding Cyt P450s, glutathione S-transferases, glycosyl- and sulfotransferases, ATP-binding cassette transporters, and MATE efflux family proteins (Supplemental Table S3). The most important protective phases of the detoxification process involve conjugation of the drug to glutathione or another hydrophilic molecule and sequestration of the conjugates into the vacuole or extrusion outside the cell (Coleman et al., 1997). In animal models, it has been shown that members of the ATP-binding cassette superfamily, including multi-drug resistance proteins (MRPs) and breast cancer resistance protein (BCRP), are high-capacity ATP-driven MTX efflux transporters (Assaraf, 2006). Therefore, by actively extruding antifolates, overexpressed MRPs and/or BCRP confer resistance to antifolate chemotherapy. In Arabidopsis, the AtMRP1 and AtMRP4 proteins have been shown to mediate transport of

MTX and/or folate (Klein et al., 2004). These two genes were not differentially expressed in MTX-treated cells. However, AtMRP2 and AtMRP3, for which the ability to transport MTX or folate has not yet been tested (Klein et al., 2006), were up-regulated to a limited extent (2- to 3-fold) in response to MTX treatment (Supplemental Table S3). Additional experiments will be necessary to determine whether these MRPs and other MTX-responsive transporters are involved in antifolate detoxification and, eventually, in the transport of physiological folates.

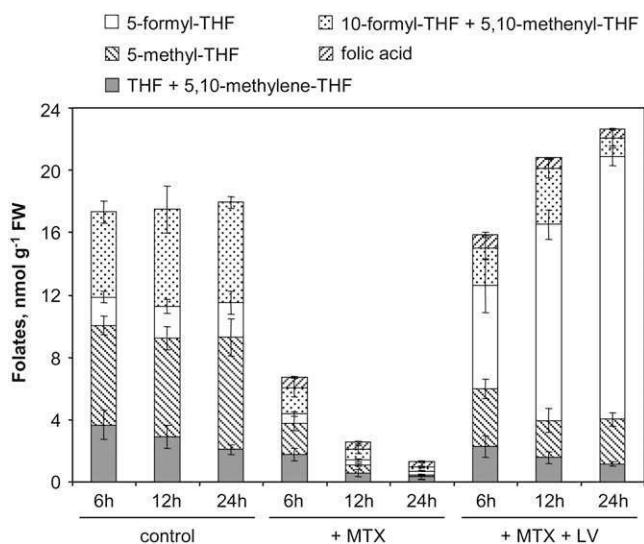
### Supplementation with Leucovorin Allows Determining the Specificity of the Response to Folate Depletion

Taken together, the above-presented data indicated that treatment with MTX was responsible for a stress response, in part related to xenobiotic-induced detoxification processes. The main goal of our study was to gain insight into the regulatory process leading to the adaptation of C1 metabolism upon perturbation of folate homeostasis. To discriminate between the response due to the undesired effects of MTX and the one associated with folate depletion, we used leucovorin (LV), a stable folate derivative (5-formyl-THF) that is administered in anticancer chemotherapy after antifolate treatment to rescue normal cells from the cytotoxicity of MTX (Stover and Schirch, 1993; McGuire, 2003). LV is an inhibitor of many folate-dependent enzymes *in vitro*, but exceptionally high levels of 5-formyl-THF do not much affect fluxes through folate-dependent reaction *in vivo* in Arabidopsis (Goyer et al., 2005). Thus, this well-tolerated folate derivative was used for supplementation assays. The new set of experiments comprised four culture conditions: cells treated with MTX (100  $\mu\text{M}$ , as for the transcriptomic studies) or LV (500  $\mu\text{M}$ ), cells treated with both compounds, and control cells. Cells were collected after 6, 12, and 24 h of exposure to the different compounds.

In this series of experiments, control cells contained  $17 \pm 3$  nmol folate/g FW, a pool that is substantially higher than the one measured in control cells used for transcriptomic studies ( $12 \pm 2$  nmol/g FW; Supplemental Table S1; Fig. 4). Cell treatment with MTX resulted in an important depletion of folate to 1.3 nmol/g FW, whereas supplementation with LV alone led to intracellular folate accumulation to elevated levels ( $>50$  nmol/g FW; Supplemental Table S1). The simultaneous addition of LV and MTX in the culture medium did not interfere with drug uptake but fully abolished the overall folate depletion induced by MTX (Fig. 4). Indeed, the folate pool was maintained above 16 nmol/g FW throughout the examined period. However, the distribution of C1 derivatives was significantly changed, with an increased ratio of 5-formyl-THF in LV-supplemented cells as compared to control cells (Fig. 4).

Analysis of the physiological parameters of cells treated with MTX and LV indicated that supplementation was associated with a partial rescue of cell growth and primary energy metabolism (Supplemen-





**Figure 4.** Measurements of folate pools in *Arabidopsis* cells treated with MTX alone or in combination with LV. Cells were grown in standard conditions or exposed to MTX (100  $\mu\text{M}$ ) alone or in combination with LV (5-formyl-THF, 500  $\mu\text{M}$ ). The following pools of folates were determined by LC-MS/MS (Zhang et al., 2005): 5-methyl-THF, 5-formyl-THF, THF plus 5,10-methylene-THF, 10-formyl-THF plus 5,10-methenyl-THF, and folic acid. Data are means of three biological replicates and sd. Values are available in Supplemental Table S1.

tal Fig. S1). It seems, therefore, that these cellular processes were not affected by overall folate depletion but rather by changes in individual C1-derivative pools, which were not restored to accurate levels in supplementation assays. The persistent deleterious effects of MTX, albeit LV supplementation, may also be due to the direct inhibition of key enzymes involved in purine and thymidylate synthesis, as demonstrated in animal models (McGuire, 2003). In animals, the folate-dependent enzymes thymidylate synthase, glycinamide ribonucleotide, and aminoimidazole-carboxamide ribonucleotide transformylases (Fig. 1) have been shown to be inhibited by MTX and by dihydrofolates, which accumulate when DHFR, the principal target of MTX, is blocked (McGuire, 2003). The parallel between the animal and plant systems is supported by two observations. First, MTX accumulated to elevated levels in *Arabidopsis* cells (Supplemental Table S1) so that the activities of the hypothetical secondary targets of MTX should be markedly impaired. Second, folic acid accumulated in *Arabidopsis* cells treated with MTX alone or in combination with LV (Fig. 4). The increase in folic acid pool was probably due to the inhibition of DHFR enzymes and the accumulation of their substrate, dihydrofolates. These compounds could not be measured directly in MTX-treated cells, because they are very labile and are in part oxidized to folic acid during the analytical procedure used for folate measurements (De Brouwer et al., 2007). Also, it is likely that dihydrofolates were oxidized to folic acid *in vivo* and

potentially catabolized to pteridines and *p*-aminobenzoylglutamate, as shown in *Escherichia coli* cells treated with the DHFR inhibitor trimethoprim (Quinlivan et al., 2000).

Together, these results indicated that supplementation of MTX-treated cells with LV prevented overall folate depletion but did not restore a folate composition similar to control cells. Moreover, the subsequent analyses of selected genes and metabolites indicated a delay in the response to folate depletion in the two sets of experiments (transcriptomic and rescue studies), likely because cells initially displayed differences in folate pool size and composition (Supplemental Table S1). Thus, the early response took place after 6 h in cells collected for the transcriptomic studies (Supplemental Table S2), whereas it was delayed to 12 h in cells used for the rescue experiments (Figs. 5 and 7). A detailed analysis of folate pools in the two sets of cultures was done to identify which derivative(s) could be responsible for the observed delay. It appears that most of the changes in gene expression and metabolite levels could be correlated to the cellular level of 5-methyl-THF, with a threshold at about 0.5 nmol/g FW below which cellular responses are induced (Supplemental Table S1). We cannot exclude that another folate derivative can act as a sensor in transcriptional and metabolic controls. For example, the level of 5,10-methylene-THF, which could not be determined because it is converted to THF during the analytical procedure, could play an important role in signaling folate depletion in *Arabidopsis* cells. In yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), the level of 5,10-methylene-THF in the cytoplasm has a direct role in signaling transcriptional control of several genes involved in C1 metabolism and *de novo* purine synthesis (Piper et al., 2000; Gelling et al., 2004). As mentioned above, the inhibition of DHFR could have resulted in the accumulation of folate catabolic products in *Arabidopsis* cells treated with MTX. Although we did not quantify pteridines and *p*-aminobenzoylglutamate, it is likely that these compounds do not play any important role in the transcriptional and metabolic responses we observed, because LV supplementation abolished or markedly reduced the effects of MTX (see below), albeit folic acid, and potentially folate catabolites, accumulated to similar levels in cells treated with MTX or MTX plus LV (Supplemental Table S1).

#### Folate Depletion Is Accompanied by a Limited Response of the Gene Network Controlling the Intracellular Folate Pool

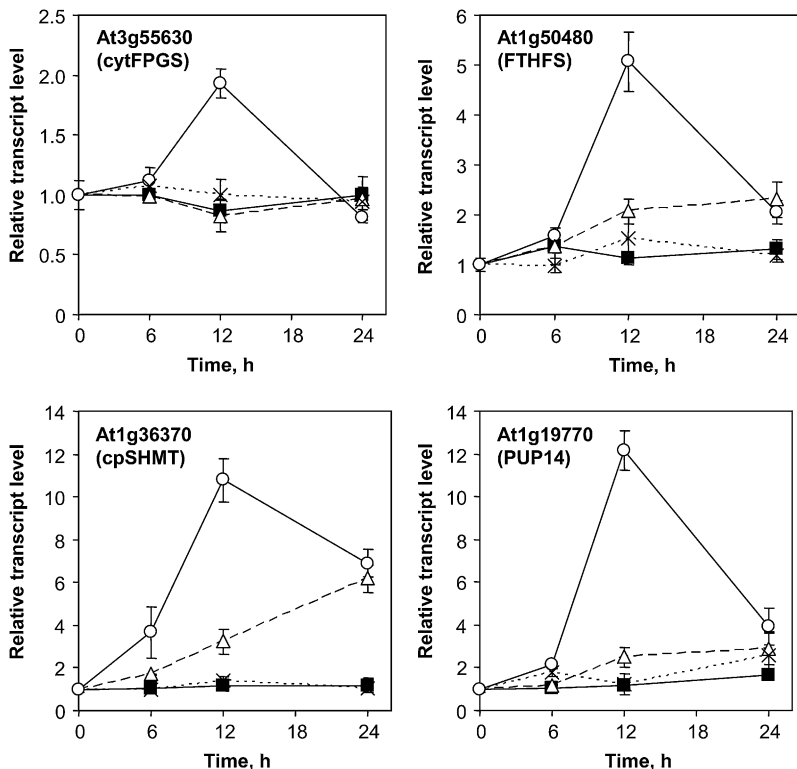
Folate-autotrophs are able to synthesize THF through a complex biosynthetic route comprising 10 reactions (Rébeillé et al., 2006). In plants, the expression level of several enzymes involved in this pathway was correlated with the pool of folate and the demand for C1 units in various physiological situations (Basset et al., 2002, 2004a, 2004b; Jabrin et al., 2003). Our work is, to our knowledge, the first genome-wide analysis of

the effect of folate limitation in a folate autotroph, providing the opportunity to study the transcriptional regulation of cofactor biosynthesis. Our transcriptomic data indicate that the expression of only one gene involved in THF synthesis was modified by folate depletion (Supplemental Table S4). This gene encodes the cytosolic isoform of folylpolyglutamate synthetase (cytFPGS), the last enzyme of the biosynthetic route, which is responsible for polyglutamylation of THF and C1-substituted folate coenzymes in the cytosol (Ravanel et al., 2001). The differential expression of the cytFPGS gene (2- to 5-fold induction) was confirmed by qPCR in both cells used for the transcriptomic analysis and the supplementation assays. The cytFPGS expression profiles illustrated the previously mentioned delay between the two series of experiments. In the first experiment, the cytFPGS transcript peaked after 6 h of exposure to MTX (Supplemental Tables S2 and S4), whereas maximal expression level was observed at 12 h in the second series of experiments (Fig. 5). The induction of the cytFPGS gene observed in MTX-treated cells was abolished in cells treated with both MTX and LV, and the steady-state level of the transcript was not affected by supplementation with LV alone (Fig. 5). This suggested that induction of cytFPGS was not a consequence of MTX or LV uptake and accumulation in cells. Rather, this adaptation was due to depletion of a natural folate, possibly 5-methyl-THF and/or 5,10-methylene-THF.

Due to its positioning at the end of THF biosynthetic pathway, cytFPGS is not assumed to change flux

toward THF synthesis but rather to influence the extent of folate glutamylation in the cytosol. Under folate-limiting conditions, there may be two advantages in favoring polyglutamylation of folates. First, folylpolyglutamates are the most efficient substrates for most folate-dependent enzymes. For example, the cytosolic and chloroplastic isoforms of Met synthase strictly depend on a polyglutamylated 5-methyl-THF derivative to catalyze their reaction (Ravanel et al., 2004). Second, folylpolyglutamates are less susceptible to catabolism and turnover (Suh et al., 2001). In the absence of transcriptional regulation of Arabidopsis genes involved in folate catabolism or salvage (Supplemental Table S4), one can propose that increasing polyglutamylation in the cytosol is an adaptation to limit folate breakdown in cells treated with MTX.

In folate-auxotroph organisms, the expression of folate transport proteins located on the plasma membrane adapts to extracellular folate levels and thus participates to the regulation of intracellular homeostasis of the cofactor (Matherly and Goldman, 2003). It appears that Arabidopsis cells do not elaborate a coordinated transcriptional regulation of key genes involved in cofactor synthesis, degradation, or trafficking to compensate folate limitation induced by MTX. This finding was unexpected, because the expression of several genes of THF biosynthesis was correlated with folate levels in many physiological situations (Basset et al., 2002, 2004a, 2004b; Jabrin et al., 2003). Also, the overexpression of genes involved in the first steps of THF synthesis led to transgenic plants



**Figure 5.** Expression profiles of genes involved in the adaptation of C1 metabolism in response to folate depletion. The relative steady-state transcript levels for At3g55630 (cytFPGS), At1g50480 (FTHFS), At1g36370 (cpSHMT), and At1g19770 (PUP14) were determined by qPCR. Control cells (■) and cells treated with MTX (○), MTX and LV (△), and LV (×) were analyzed after 0, 6, 12, and 24 h of treatment. The actin2/7 gene (At5g09810) was used to normalize qPCR data. Data are means of three biological replicates and sd.

with increased folate levels (Diaz de la Garza et al., 2007; Storozhenko et al., 2007). Together, our data suggest that folate level does not exert feedback transcriptional control on its own biosynthetic route, a situation that does not exclude regulation through posttranscriptional events.

#### The Imbalanced Activity of the Methyl Cycle Induced by 5-Methyl-THF Limitation Cannot Be Compensated through Transcriptional Response

The pool of 5-methyl-THF was rapidly reduced in cells treated with MTX. As a consequence, the homeostasis of the intermediates of the activated methyl cycle was markedly affected, as previously observed by Loizeau et al. (2007). Thus, after 6 h of treatment, 5-methyl-THF was reduced by approximately 70% as compared to controls (Fig. 4) and S-adenosylhomocysteine (AdoHcy), the by-product of AdoMet-methyltransferases (MTases), accumulated by 5-fold (Fig. 6). The rise in the AdoHcy pool could be attributed to the activity of AdoHcy hydrolase, a cytosolic reversible enzyme that catalyzes the hydrolysis of AdoHcy into homo-Cys (Hcy) and adenosine (Fig. 1). The hydrolytic reaction is only favored by removal of reaction products through the enzymes Met synthase and adenosine kinase, respectively (Moffatt and Weretilnyk, 2001). In MTX-treated cells, 5-methyl-THF depletion most probably impaired the reaction catalyzed by Met synthase, thus limiting the removal of Hcy in the cytosol and favoring AdoHcy hydrolase in the direction of AdoHcy synthesis (Fig. 1; Loizeau et al., 2007). In the very early phase (6 h) of the response, the other key intermediates of the activated methyl cycle did not change significantly (Fig. 6), suggesting that the conversion of Hcy to AdoHcy was a metabolic priority, probably to avoid the toxic effect of this compound (Perla-Kajan et al., 2007); and the synthesis of Met and AdoMet was sufficient to follow the demand for anabolic reactions (e.g. protein, ethylene, and polyamine synthesis). To support this last assumption, it is worth noting that the  $K_m$  value for chloroplastic Met synthase is 4-fold lower than for the cytosolic isoforms (17 versus 60  $\mu\text{M}$ , respectively; Ravanel et al., 2004), suggesting that upon 5-methyl-THF limitation, the de novo synthesis of Met in plastids could be less affected than Met recycling in the cytosol.

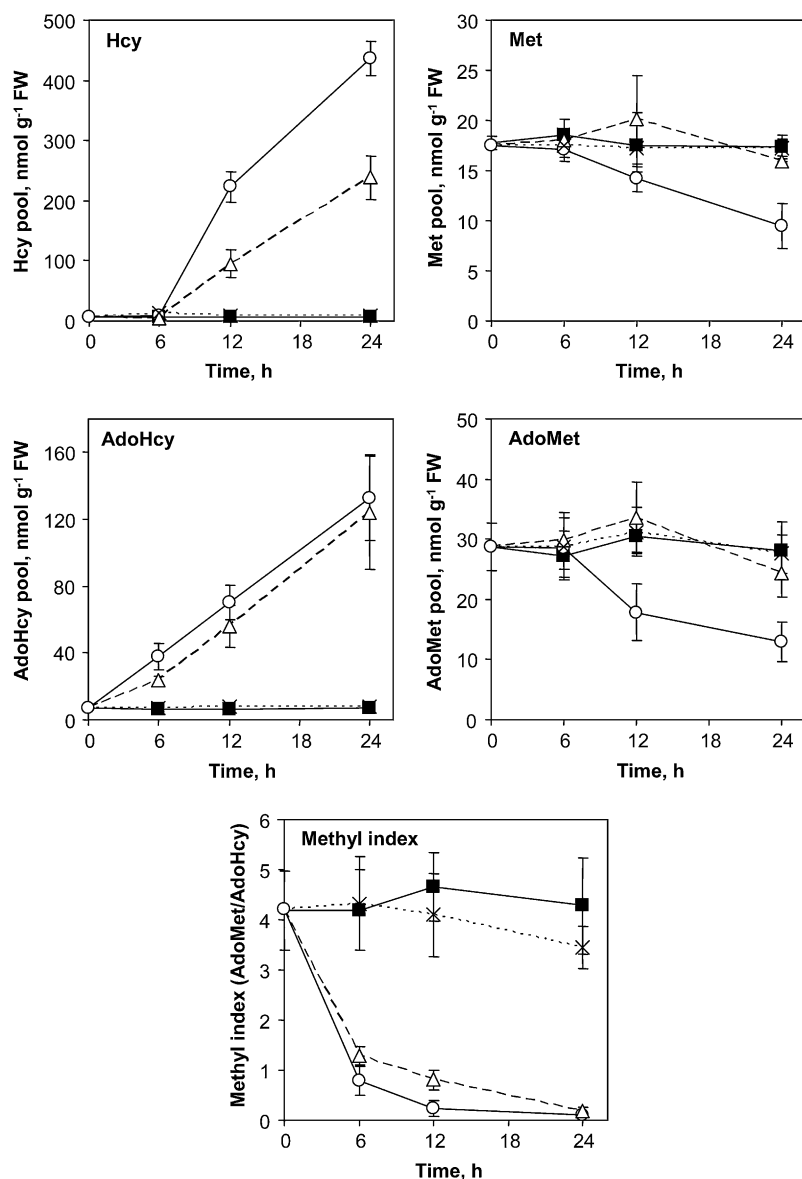
The major consequence of the AdoHcy increase was a 5-fold reduction in the AdoMet to AdoHcy ratio (referred to as the methyl index), which is an indicator of the cell capacity to perform methylation reactions. Indeed, AdoMet-dependent MTases are strongly inhibited by AdoHcy, which behaves as a competitive inhibitor to the substrate AdoMet (Moffatt and Weretilnyk, 2001). Despite these important changes that could have short-term deleterious effects on cell physiology, the key genes involved in the activated methyl cycle were not differentially regulated during the early response to MTX (Supplemental Table S4).

Thus, the imbalanced activity of the cycle initiated after 6 h of exposure to MTX propagated until the end of the treatment. As a consequence, AdoHcy and then Hcy accumulated to elevated levels, and the Met and AdoMet pools progressively declined, probably because of an imbalance between fluxes of regeneration and utilization of these metabolites (Fig. 6). Supplementation of MTX-treated cells with LV allowed to maintain the 5-methyl-THF pool at  $50\% \pm 10\%$  of the control levels (Fig. 4), a situation that was sufficient to prevent Met and AdoMet changes (Fig. 6). However, this reduction was sufficient to trigger AdoHcy and Hcy, to a lower extent, accumulation, suggesting again that the cytosolic Met synthases were more sensitive to 5-methyl-THF limitation than their chloroplastic counterpart. In the late phase of the response (24 h), several genes coding enzymes of the activated methyl cycle were down-regulated (Supplemental Table S4), suggesting an attempt to adapt to long-term perturbation of the cycle. In this regard, it has been shown previously that a persistent situation of folate deficiency was associated with a posttranslational modification of the first enzyme specific for de novo Met synthesis and a restoration of Met and AdoMet homeostasis (Loizeau et al., 2007).

After 12 and 24 h of exposure to MTX, the methyl index was reduced by 20- to 40-fold, respectively, suggesting a dramatic impairment in cell ability to perform methylation reactions. Even though, our transcriptomic data indicated that only a limited number of genes coding MTases were differentially expressed under these conditions. Among the 135 genes coding MTases in the Arabidopsis genome, only four were up-regulated and six were down-regulated with at least 2-fold changes in response to MTX treatment (Supplemental Table S4). Three of these differentially expressed MTases are involved in the biogenesis of sterols, which are structural components of membranes and precursors of steroid hormones (He et al., 2003). The potential role of these compounds in the adaptation of Arabidopsis cells to folate depletion is not known. Together, these results indicated that, despite the probable marked limitation of MTases activities, transcriptional regulation of most, if not all, genes coding these enzymes was not dependent on the methyl index.

#### Folate Depletion Is Associated with a Reorientation of C1 Units toward the Synthesis of Nucleotides in Plastids

The pool of folate is made of a dynamic equilibrium of coenzymes carrying C1 units at different oxidation levels and having different metabolic fates. Several genes coding enzymes involved in the loading of C1 units onto THF and in the conversion of C1 units were differentially expressed in cells treated with MTX (Supplemental Table S4). As previously mentioned, genes coding mitochondrial SHMT and several subunits of the Gly decarboxylase complex were down-regulated in the late phase of the response to MTX



**Figure 6.** Analysis of key intermediates of the activated methyl cycle in Arabidopsis cells treated with MTX and LV. Control cells (■) and cells treated with MTX (○), MTX and LV (△), and LV (×) were analyzed after 0, 6, 12, and 24 h of treatment. The pools of Met, Hcy, AdoMet, and AdoHcy were determined by RP-HPLC after derivatization with specific probes as described in "Materials and Methods." The methyl index was determined as the AdoMet to AdoHcy ratio. Data are means of three biological replicates and SD.

treatment. We found that the transcripts coding 10-formyl-THF synthetase (FTHFS) and chloroplastic SHMT (cpSHMT) were up-regulated in the early phase of the response (Fig. 5; Supplemental Tables S2 and S4). The up-regulation of these genes was markedly reduced in cells supplemented with LV, suggesting that these changes were associated with a limitation in folate availability, possibly 5-methyl-THF and/or 5,10-methylene-THF. Moreover, these results suggested a reorientation of C1 metabolism in plastids to favor the synthesis of 10-formyl-THF and/or 5,10-methylene-THF and thus to allocate C1 units toward the synthesis of nucleotides in this compartment (Fig. 1). First, the ATP-dependent condensation of formate and THF to produce 10-formyl-THF is catalyzed by FTHFS, an enzyme found in the cytosol, mitochondria, and plastids (Hanson and Roje, 2001).

Also, the de novo purine biosynthetic pathway, including the 10-formyl-THF-dependent glycinamide ribonucleotide and aminoimidazole-carboxamide ribonucleotide formyltransferases, is located in plastids in Arabidopsis (Zrenner et al., 2006). Second, cpSHMT is involved in the conversion of Ser and THF into Gly and 5,10-methylene-THF (Besson et al., 1995). A bifunctional DHFR/thymidylate synthase is present in plastids (Luo et al., 1997) and could allow the 5,10-methylene-dependent methylation of dUMP to dTMP. The reorientation of C1 metabolism toward the synthesis of nucleotides in plastids was strengthened by the simultaneous up-regulation of the AtPUP14 gene coding a putative purine transporter (Fig. 5). Because this transporter is predicted to be located in chloroplasts (TargetP server; Emanuelsson et al., 2000), one can suggest that it will be involved in the efflux of

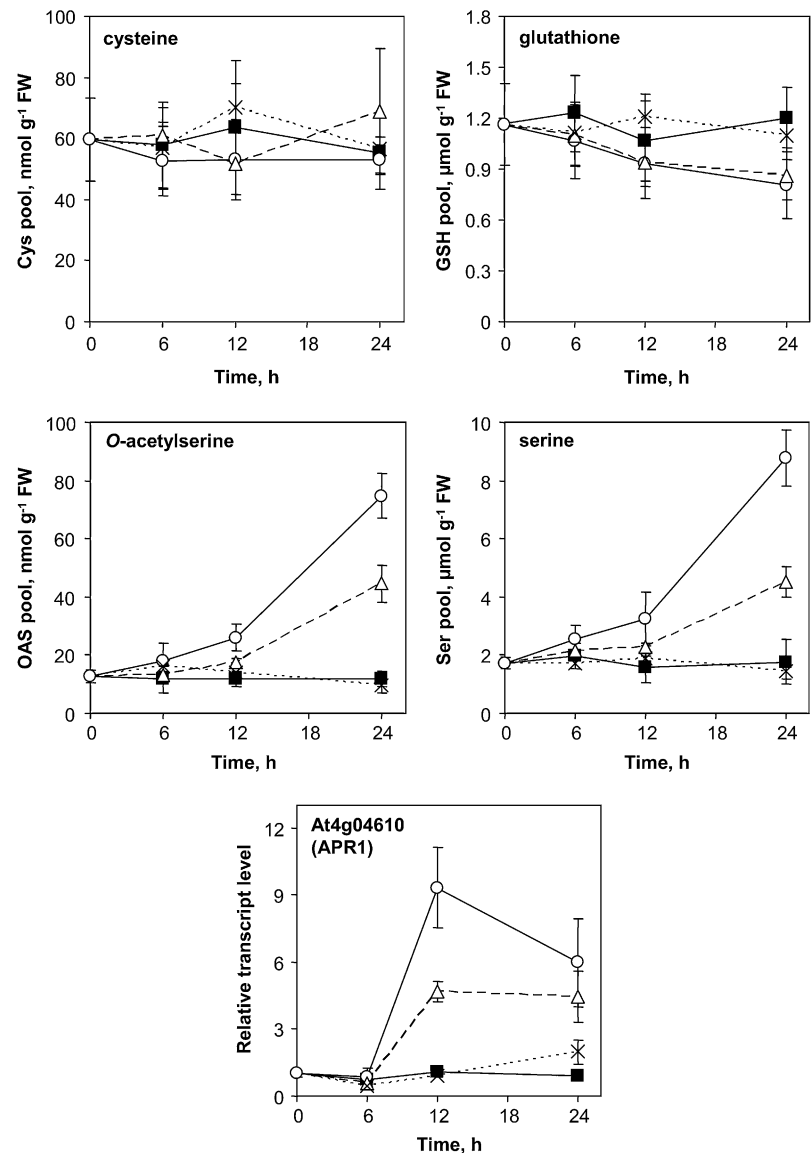
purine outside of plastids to sustain metabolic processes in the rest of the cell.

### Folate Depletion Induces *O*-Acetylserine Accumulation and Up-Regulates the Sulfate Assimilatory Pathway

The genome-wide analysis of MTX-treated *Arabidopsis* cells revealed a set of genes involved in the sulfate assimilatory pathway. Most of these genes were up-regulated in the early phase of the response and encode sulfate transporters and key enzymes involved in sulfate activation, reduction, and incorporation into Cys (Supplemental Table S5). The induction of these genes, e.g. APR1 coding adenosine 5'-phosphosulfate reductase (Fig. 7), is characteristic for the adaptive response of plant to sulfur (S) deficiency (Hirai et al., 2003; Nikiforova et al., 2003). Under S-limiting conditions, the pools of the S-containing metabolites Cys

and glutathione are also markedly reduced (Hirai et al., 2004; Nikiforova et al., 2005). Our metabolic analyses indicated that folate depletion was not associated with significant changes in the level of Cys and that the pool of glutathione was reduced by about 30% after 24 h of exposure to MTX (Fig. 7). However, we found that *O*-acetylserine (OAS), a key intermediate of sulfate assimilation, accumulated in folate-depleted cells (Fig. 7). OAS has been shown to act as a regulator of global transcript and metabolites profiles under S-limiting conditions (Hirai et al., 2004; Nikiforova et al., 2005). Thus, OAS accumulation in the early phase of the response to MTX treatment was probably at the origin of the observed transcriptional response. OAS is synthesized from Ser and acetyl-CoA by the enzyme Ser acetyltransferase (Wirtz and Droux, 2005). In MTX-treated cells, the pool of Ser increased gradually, and this could be attributed to an impairment of the

**Figure 7.** Measurements of key metabolites and gene of S metabolism in folate-depleted cells. Control cells (■) and cells treated with MTX (○), MTX and LV (△), and LV (×) were analyzed after 0, 6, 12, and 24 h of treatment. The pools of Cys and glutathione, on the one hand, and of OAS and Ser, on the other hand, were determined by RP-HPLC after derivatization with monobromobimane and *O*-phthalaldehyde, respectively. The relative steady-state transcript level for At4g04610 (APR1) was determined by qPCR. The actin2/7 gene (At5g09810) was used to normalize qPCR data. Data are means of three biological replicates and sd.



conversion of Ser into Gly catalyzed by the folate-dependent enzyme SHMT (Fig. 1; Prabhu et al., 1998; Loizeau et al., 2007). We suggest that the increase in Ser levels in MTX-treated cells was at the origin of the elevation of OAS through an increased activity of Ser acetyltransferase. This assumption is supported by the previous finding that Ser application to Arabidopsis plants increased OAS levels and induced S deficiency response (Ohkama-Ohtsu et al., 2004). Also, in cells treated with MTX and LV, we found that the accumulation of Ser, OAS, and transcripts of the S-responsive gene APR1 was less important and delayed as compared to cells treated with MTX alone (Fig. 7). Together, these data indicated that folate depletion mimicked S deficiency response through the OAS-mediated coordinated transcriptional regulation of key genes of the sulfate assimilatory pathway.

## CONCLUSION

The present genome-wide and metabolic analysis revealed several adaptive responses of Arabidopsis cells to MTX treatment and perturbation of folate homeostasis. Transcriptomic data indicated that MTX treatment induced a stress response and suggested that a protective effect builds up rapidly after cellular uptake of the drug. Similar stress-responsive effects have been associated with antifolate application or folate depletion in bacteria, animal models, fly, and yeast (e.g. Huang et al., 1997, 2004; Gelling et al., 2004; Affleck et al., 2006). As a consequence of the multiplicity of cellular functions in which folate derivatives are involved, perturbations to this network had far-reaching consequences. Thus, modification of nucleotide homeostasis resulted in cell division arrest and in reduction of energy metabolism. Also, impairment of Ser catabolism led to OAS accumulation and to a transcriptional response typical of S starvation.

Regarding C1 metabolism, the major adaptive response of Arabidopsis cells to folate depletion concerned the composition of the folate pool rather than the intracellular level of cofactors. Indeed, no significant change in the expression of genes that could have increased the flux toward THF production was observed. However, the distribution of C1 derivatives as well as the expression of several genes coding enzymes manipulating C1 moieties was significantly affected in depleted cells. Because of the predominance of 5-methyl-THF over other folate derivatives in many plant organs, tissues, or cells, previous studies concluded that the synthesis of Met and AdoMet was a metabolic priority in many physiological situations (Hanson and Roje, 2001; Rébeillé et al., 2006). Our study indicates that this situation is not true in Arabidopsis cells for which the pool of folate is limited by the use of MTX. Indeed, no genomic or metabolic adaptation was built up to counterbalance the major impairment of the methyl index, which controls methylation of essential metabolites, proteins, and nucleic

acids in the cell. However, folate depletion was associated with increased expression levels for transcripts coding FTHFS, cpSHMT, and a purine transporter, suggesting a reorientation of C1 units toward the synthesis of purine and thymidylate in plastids. To summarize, the metabolic priority of Arabidopsis cells in response to folate limitation was to shuttle the available folate derivatives to the synthesis of nucleotides at the expense of AdoMet synthesis and methylation reactions. Similar conclusions were obtained using human colonic epithelial cells grown in folate-deficient conditions (Hayashi et al., 2007). Moreover, it was proposed that, under certain conditions, the cytoplasmic SHMT acts as a switch to modulate nucleotide synthesis and methylation reactions in animal cells (Herbig et al., 2002). In yeast, a limitation in the cytoplasmic pool of 5,10-methylene-THF was associated with the co-induction of several genes involved in C1 metabolism (referred to as the C1 regulon) as well as genes for enzymes of de novo purine biosynthesis (Gelling et al., 2004). In contrast to the situation existing in plant and animal cells, co-regulation of the C1 regulon and purine synthesis in yeast was not at the expense of Met and AdoMet synthesis. Together, the data obtained in folate-auxotroph and folate-autotroph organisms indicate that C1 metabolism operates as a flexible system whereby folate composition is adapted to maintain the supply of C1 units to anabolic pathways.

## MATERIALS AND METHODS

### Cells and Growth Conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) ecotype Columbia cell suspension cultures were grown under continuous light ( $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at 22°C with rotary agitation at 125 rpm in Gamborg's B5 medium supplemented with  $1 \mu\text{M}$  2-naphthalene acetic acid and 1.5% (w/v) Suc. Cells were subcultured every 7 d, and chemicals were added to cultures at the beginning of exponential growing phase (3 d after subcloning). At each time point, cells were collected, washed with distilled water, weighed, and frozen in liquid nitrogen. Each experiment was done in triplicate.

### Measurements of Respiration, Photosynthesis, and Cell Viability

Measurements of respiration rate were done in 1 mL of Gamborg's B5 medium containing 50 mM sodium bicarbonate, and oxygen consumption was determined in the darkness using an  $\text{O}_2$  electrode (Hansatech, Eurosep Instruments) at 25°C. Photosynthetic activities were determined in the same conditions using a white light source of  $2,000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Cell viability was determined using the vital dye fluorescein diacetate, as described by Loizeau et al. (2007).

### Measurements of Metabolites

Determination of folates was done by LC-MS/MS as described by Zhang et al. (2005). Following extraction, folylpolyglutamates were deconjugated in the presence of rat serum to generate the corresponding monoglutamate derivatives. Folates and MTX eluted from the RP-18 column were detected by electrospray ionization on an Applied Biosystems API4000 tandem quadrupole mass spectrometer. Because the stability and eventual interconversion of folates are affected during the typical sample preparation steps (De Brouwer et al., 2007), the final quantitative data were simplified to five pools of folates:

5-methyl-THF, 5-formyl-THF, THF plus 5,10-methylene-THF, 10-formyl-THF plus 5,10-methylene-THF, and folic acid.

Soluble amino acids and thiols were extracted in aqueous ethanol buffers and quantified by reverse-phase HPLC after derivatization with *O*-phthalaldehyde and monobromobimane, respectively, as described by Loizeau et al. (2007). AdoMet and AdoHcy measurements were done by reverse-phase HPLC after derivatization with chloro-acetaldehyde (Loizeau et al., 2007).

## Transcriptome Studies

Microarray analysis was performed with the CATMA array containing 24,576 gene-specific tags corresponding to 22,089 genes from Arabidopsis (Crowe et al., 2003; Hilson et al., 2004). Five comparisons were analyzed in our time-course analysis of Arabidopsis cell response to MTX (Fig. 2). In comparisons 1 to 3, arrays were hybridized with cRNA from control and MTX-treated cells at each time point of the kinetic. Comparisons 4 and 5 corresponded to hybridization with cRNA from MTX-treated cells at 2 and 6 h, and at 6 and 24 h, respectively. For each comparison, we performed a repeat using a second set of cell samples originating from an independent biological repeat. In addition, to avoid dye bias and gene-specific dye bias, a dye-swap experiment was carried out. Therefore, four arrays were used for each comparison. Total RNA was extracted from Arabidopsis cells using the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. RNA integrity, cDNA synthesis, hybridization, and array scanning were performed as described by Lurin et al. (2004).

## Statistical Analysis of Microarray Data

Statistical analysis was based on two dye swaps (i.e. four arrays, each containing 24,576 gene-specific tags and 384 controls) as described in Gagnot et al. (2008). To determine differentially expressed genes, we performed a paired *t*-test on the log ratios, assuming that the variance of the log ratios was the same for all genes. Spots displaying extreme variance (too small or too large) were excluded. The raw *P*-values were adjusted by the Bonferroni method, which controls the Family Wise Error Rate. We considered as being differentially expressed the genes with a Bonferroni *P*-value  $\leq 0.05$ , as described in Gagnot et al. (2008). We use the Bonferroni method with a type I error equal to 5% to keep a strong control of the false positives in a multiple-comparison context.

Microarray data from this article were deposited at Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; accession no. GSE10675) and at CATdb (<http://urgv.evry.inra.fr/CATdb/>; project CEA06-02\_Folate) according to the Minimum Information About a Microarray Experiment standards.

## qRT-PCR

qRT-PCR experiments were performed using cDNA synthesized from total RNA isolated from control and treated Arabidopsis cells (Reverse-it first strand synthesis kit, ABgene). Specific primer sequences designed for each gene selected for analysis are available in Supplemental Table S6. The real-time PCR reactions were carried out on a Rotor-Gene 3000 instrument (Corbett Research) using SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich). Quantification of gene expression was performed using the comparative  $C_T$  method with the Rotor-Gene 3000 software. The actin2/7 gene (At5g09810) was used to normalize qPCR data.

## Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** Physiological parameters of Arabidopsis cells treated with MTX and LV.

**Supplemental Figure S2.** MapMan-generated overview of MTX-responsive genes involved in respiration and photosynthesis.

**Supplemental Table S1.** Folate measurements in Arabidopsis cells used for the transcriptomic studies (A) and the rescue experiments (B).

**Supplemental Table S2.** Validation of the microarray data by qPCR.

**Supplemental Table S3.** Selected MTX-responsive genes that may be involved in the regulation of cell cycle and response to stress.

**Supplemental Table S4.** Expression of genes associated with C1 metabolism in Arabidopsis cells treated with MTX.

**Supplemental Table S5.** Expression of genes involved in the sulfate assimilatory pathway in Arabidopsis cells treated with MTX.

**Supplemental Table S6.** Sequences of primers used for qPCR.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Julie Fiévet for her assistance with the transcriptomic data analysis and to Drs. Claude Alban and Eric Maréchal for helpful discussions and critical reading of the manuscript. We thank Professor Roland Douce for stimulating discussions.

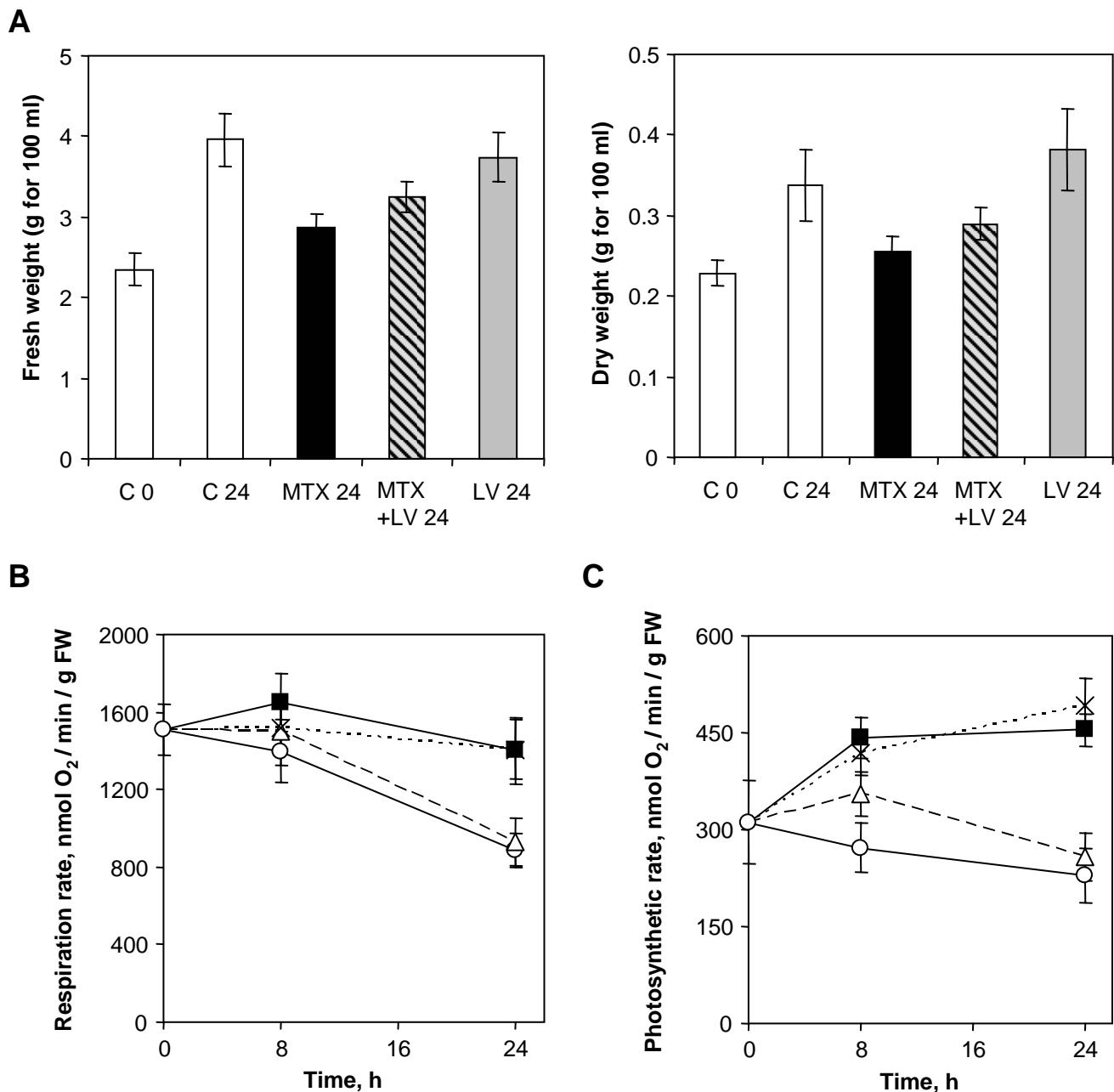
Received September 25, 2008; accepted October 15, 2008; published October 17, 2008.

## LITERATURE CITED

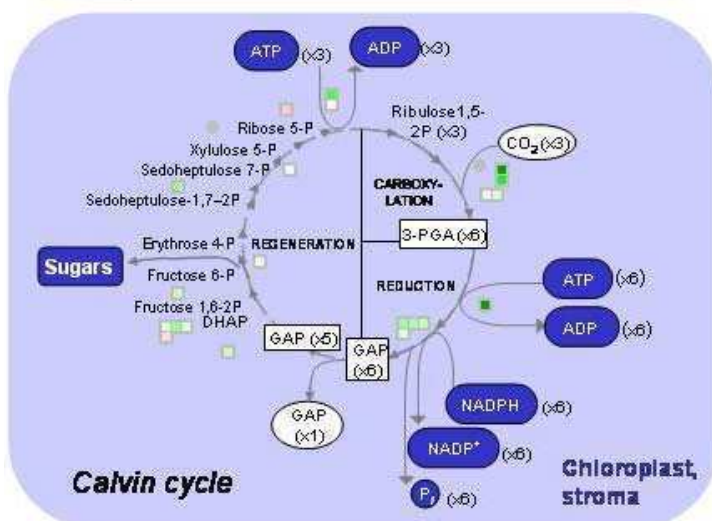
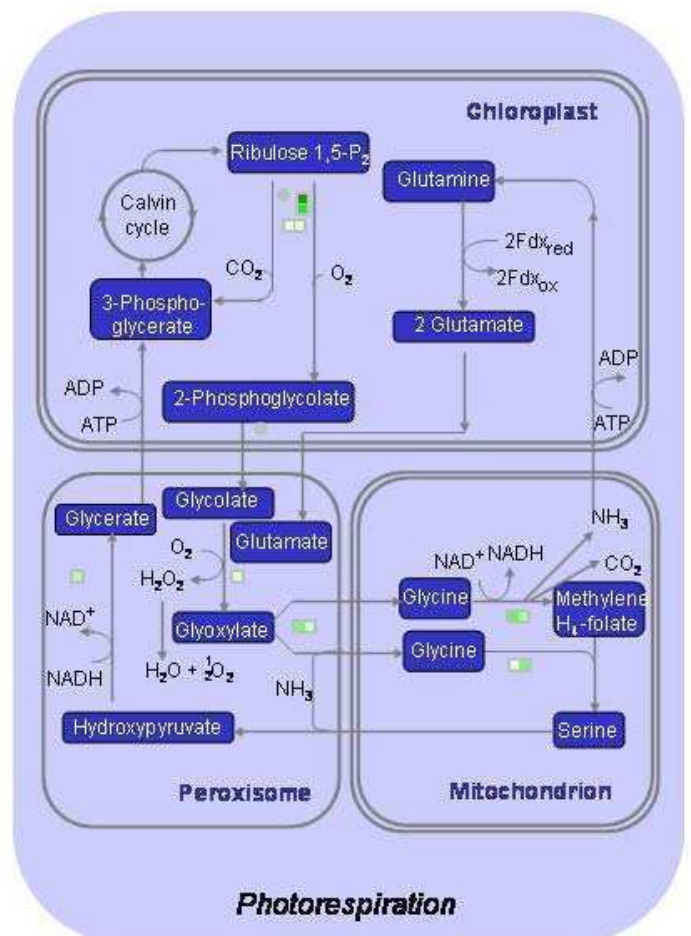
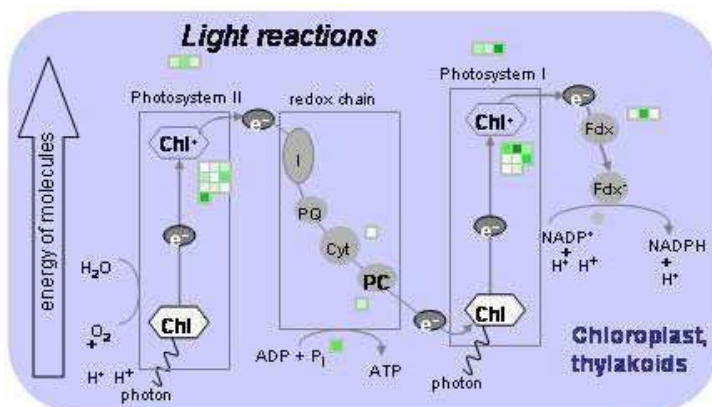
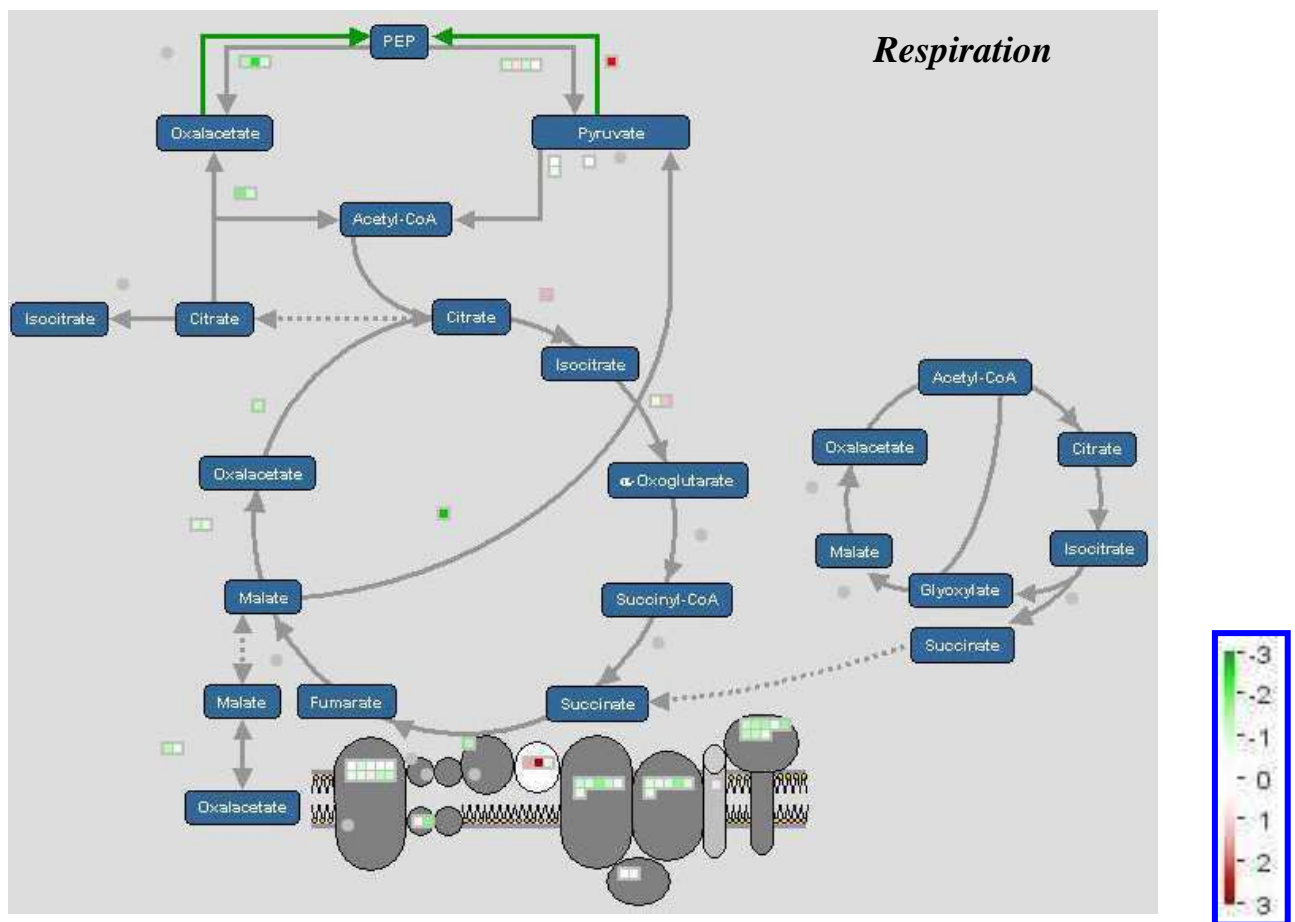
- Affleck JG, Neumann K, Wong L, Walker VK (2006) The effects of methotrexate on *Drosophila* development, female fecundity, and gene expression. *Toxicol Sci* **89**: 495–503
- Assaraf YG (2006) The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat* **9**: 227–246
- Basset G, Quinlivan EP, Ziemak MJ, Diaz De La Garza R, Fischer M, Schiffmann S, Bacher A, Gregory JF III, Hanson AD (2002) Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12489–12494
- Basset GJ, Quinlivan EP, Ravel S, Rebeille F, Nichols BP, Shinozaki K, Seki M, Adams-Phillips LC, Giovannoni JJ, Gregory JF III, et al (2004a) Folate synthesis in plants: the p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1496–1501
- Basset GJ, Ravel S, Quinlivan EP, White R, Giovannoni JJ, Rebeille F, Nichols BP, Shinozaki K, Seki M, Gregory JF III, et al (2004b) Folate synthesis in plants: the last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase. *Plant J* **40**: 453–461
- Besson V, Rebeille F, Neuburger M, Douce R, Cossins EA (1995) Evidence for three serine hydroxymethyltransferases in green leaf cells. Purification and characterisation of the mitochondrial and the chloroplastic isoforms. *Plant Physiol Biochem* **33**: 665–673
- Clifton R, Millar AH, Whelan J (2006) Alternative oxidases in Arabidopsis: a comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 730–741
- Coleman JOD, Blake-Kalff MMA, Davies TGE (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci* **2**: 144–151
- Crowe ML, Serizet C, Thareau V, Aubourg S, Rouze P, Hilson P, Beynon J, Weisbeek P, van Hummelen P, Raymond P, et al (2003) CATMA: a complete Arabidopsis GST database. *Nucleic Acids Res* **31**: 156–158
- De Brouwer V, Zhang GF, Storozhenko S, Straeten DV, Lambert WE (2007) pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochem Anal* **18**: 496–508
- Diaz de la Garza RI, Gregory JF III, Hanson AD (2007) Folate biofortification of tomato fruit. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 4218–4222
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rebeille F (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci* **6**: 167–176
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**: 1005–1016
- Francis D (2007) The plant cell cycle: 15 years on. *New Phytol* **174**: 261–278
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi E, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 436–442
- Gagnot S, Tamby JP, Martin-Magniette ML, Bitton F, Taconnat L, Balzergue S, Aubourg S, Renou JP, Lecharny A, Brunaud V (2008) CATdb: a public access to Arabidopsis transcriptome data from the URGV-CATMA platform. *Nucleic Acids Res* **36**: D986–D990

- Gambonnet B, Jabrin S, Ravanel S, Karan M, Douce R, Rebeille F (2001) Folate distribution during higher plant development. *J Sci Food Agric* **81**: 835–841
- Gelling CL, Piper MDW, Hong SP, Kornfeld GD, Dawes IW (2004) Identification of a novel one-carbon metabolism regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 7072–7081
- Goyer A, Collakova E, Diaz de la Garza R, Quinlivan EP, Williamson J, Gregory JF III, Shachar-Hill Y, Hanson AD (2005) 5-Formyltetrahydrofolate is an inhibitory but well tolerated metabolite in *Arabidopsis* leaves. *J Biol Chem* **280**: 26137–26142
- Groppa MD, Benavides MP (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* **34**: 35–45
- Guo AY, Chen X, Gao G, Zhang H, Zhu QH, Liu XC, Zhong YE, Gu X, He K, Luo J (2008) PlantTFDB: a comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res* **36**: D966–D969
- Hanson AD, Roje S (2001) One-carbon metabolism in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 119–137
- Hayashi I, Sohn KJ, Stempak JM, Croxford R, Kim YI (2007) Folate deficiency induces cell-specific changes in the steady-state transcript levels of genes involved in folate metabolism and 1-carbon transfer reactions in human colonic epithelial cells. *J Nutr* **137**: 607–613
- He JX, Fujioka S, Li TC, Kang SG, Seto H, Takatsuto S, Yoshida S, Jang JC (2003) Sterols regulate development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**: 1258–1269
- Herbig K, Chiang EP, Lee LR, Hills J, Shane B, Stover PJ (2002) Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. *J Biol Chem* **277**: 38381–38389
- Hilson P, Allemeersch J, Altmann T, Aubourg S, Avon A, Beynon J, Bhalerao RP, Bitton F, Caboche M, Cannoot B, et al (2004) Versatile gene-specific sequence tags for *Arabidopsis* functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Res* **14**: 2176–2189
- Hirai MY, Fujiwara T, Awazuwara M, Kimura T, Noji M, Saito K (2003) Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA microarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J* **33**: 651–663
- Hirai MY, Yano M, Goodenowe DB, Kanaya S, Kimura T, Awazuwara M, Arita M, Fujiwara T, Saito K (2004) Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 10205–10210
- Huang EY, Mohler AM, Rohlman CE (1997) Protein expression in response to folate stress in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 5648–5653
- Huang Q, Jin X, Gaillard ET, Knight BL, Pack FD, Stoltz JH, Jayadev S, Blanchard KT (2004) Gene expression profiling reveals multiple toxicity endpoints induced by hepatotoxicants. *Mutat Res* **549**: 147–167
- Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, Douce R, Rebeille F (2003) One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol* **131**: 1431–1439
- Kidd BR, Stephen NH, Duncan HJ (1982) The effect of asulam on purine biosynthesis. *Plant Sci Lett* **26**: 211–217
- Klein M, Burla B, Martinoia E (2006) The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Lett* **580**: 1112–1122
- Klein M, Geisler M, Suh SJ, Kolkusaoglu HU, Azevedo L, Plaza S, Curtis MD, Richter A, Weder B, Schulz B, et al (2004) Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J* **39**: 219–236
- Loizeau K, Gambonnet B, Zhang GF, Curien G, Jabrin S, Van Der Straeten D, Lambert WE, Rebeille F, Ravanel S (2007) Regulation of one-carbon metabolism in *Arabidopsis*: the N-terminal regulatory domain of cystathionine gamma-synthase is cleaved in response to folate starvation. *Plant Physiol* **145**: 491–503
- Luo M, Orsi R, Patrucco E, Pancaldi S, Cella R (1997) Multiple transcription start sites of the carrot dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene, and sub-cellular localization of the bifunctional protein. *Plant Mol Biol* **33**: 709–722
- Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, et al (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**: 2089–2103
- Matherly LH, Goldman DI (2003) Membrane transport of folates. *Vitam Horm* **66**: 403–456
- McGuire JJ (2003) Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr Pharm Des* **9**: 2593–2613
- Moffatt BA, Weretilnyk EA (2001) Sustaining S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiol Plant* **113**: 435–442
- Nikiforova V, Freitag J, Kempa S, Adamik M, Hesse H, Hoefgen R (2003) Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant J* **33**: 633–650
- Nikiforova VJ, Kopka J, Tolstikov V, Fiehn O, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hesse H, Hoefgen R (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* **138**: 304–318
- Ohkama-Ohtsu N, Kasajima I, Fujiwara T, Naito S (2004) Isolation and characterization of an *Arabidopsis* mutant that overaccumulates O-acetyl-L-Ser. *Plant Physiol* **136**: 3209–3222
- Perla-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H (2007) Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids* **32**: 561–572
- Piper MD, Hong SP, Ball GE, Dawes IW (2000) Regulation of the balance of one-carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 30987–30995
- Poll AM, Missonier C, Grandbastien MA, Caboche M (1984) Growth-inhibition of tobacco protoplast-derived cells by methotrexate: relationships with nitrate assimilation. *Plant Sci Lett* **36**: 169–176
- Prabhu V, Chatson KB, Lui H, Abrams GD, King J (1998) Effects of sulfanilamide and methotrexate on 13C fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **116**: 137–144
- Quinlivan EP, McPartlin J, Weir DG, Scott J (2000) Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited. *FASEB J* **14**: 2519–2524
- Ravanel S, Block MA, Rippert P, Jabrin S, Curien G, Rebeille F, Douce R (2004) Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem* **279**: 22548–22557
- Ravanel S, Cherest H, Jabrin S, Grunwald D, Surdin-Kerjan Y, Douce R, Rebeille F (2001) Tetrahydrofolate biosynthesis in plants: molecular and functional characterization of dihydrofolate synthetase and three isoforms of folylpolyglutamate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 15360–15365
- Rébeillé F, Ravanel S, Jabrin S, Douce R, Storozhenko S, Van Der Straeten D (2006) Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiol Plant* **126**: 330–342
- Roje S (2006) S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* **67**: 1686–1698
- Ruepp A, Zollner A, Maier D, Albermann K, Hani J, Mokrejs M, Tetko I, Guldener U, Mannhaupt G, Munsterkotter M, et al (2004) The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**: 5539–5545
- Storozhenko S, De Brouwer V, Volckaert M, Navarrete O, Blancquaert D, Zhang GF, Lambert W, Van Der Straeten D (2007) Folate fortification of rice by metabolic engineering. *Nat Biotechnol* **25**: 1277–1279
- Stover P, Schirch V (1993) The metabolic role of leucovorin. *Trends Biochem Sci* **18**: 102–106
- Suh JR, Herbig AK, Stover PJ (2001) New perspectives on folate catabolism. *Annu Rev Nutr* **21**: 255–282
- Voll LM, Jamai A, Renne P, Voll H, McClung CR, Weber AP (2006) The photorespiratory *Arabidopsis* *shm1* mutant is deficient in SHM1. *Plant Physiol* **140**: 59–66
- Wirtz M, Droux M (2005) Synthesis of the sulfur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynth Res* **86**: 345–362
- Wu K, Atkinson IJ, Cossins EA, King J (1993) Methotrexate resistance in *Datura innoxia* (uptake and metabolism of methotrexate in wild-type and resistant cell lines). *Plant Physiol* **101**: 477–483
- Zhang GF, Storozhenko S, Van Der Straeten D, Lambert WE (2005) Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1078**: 59–66
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**: 2621–2632
- Zrenner R, Stitt M, Sonnwald U, Boldt R (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 805–836





**Supplemental Figure S1. Physiological parameters of Arabidopsis cells treated with MTX and leucovorin.** Cells were grown for up to 24h in standard conditions or in the presence of MTX (100  $\mu$ M) and leucovorin (LV, 500  $\mu$ M), alone or in combination. **A** – Cell growth was estimated through measurements of fresh and dry weights of cultures after 24h of exposure to the different chemicals. C0, control cells at time zero. **B**, **C** – Respiratory and photosynthetic rates were determined in freshly prepared culture medium containing 50 mM bicarbonate in the darkness or with a white light source of 2000  $\mu$ mol of photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, respectively. Control cells (■) and cells treated with MTX (○), MTX and LV (△), and LV (×) were analyzed after 0, 8, and 24h of treatment. Data are means of two biological replicates and SD.



**Supplemental Figure S2. MapMan-generated overview of MTX-responsive genes involved in respiration and photosynthesis.** Genes that are differentially expressed between MTX-treated and control cells after 24h of treatment were analyzed using the MapMan tool with maps downloaded from the MapMan website (Thimm et al, 2004). Differentially expressed genes are represented by colored boxes according to the  $\log_2(\text{ratio})$  values. Genes induced by MTX are shown as red, the one repressed by MTX as green.

**Supplemental Table S1. Folate measurements in Arabidopsis cells used for the transcriptomic studies (A) and the rescue experiments (B).**

In two independent series of experiments, Arabidopsis cells were grown in standard conditions or exposed to MTX (100  $\mu$ M) and/or leucovorin (LV, 500  $\mu$ M) over a 24h period. Folates were analyzed by LC-MS/MS as described by Zhang et al. (2005). Using this procedure, 5,10-methylene-THF is converted to THF and 10-formyl-THF is oxidized to 10-formyl-folic acid or converted to 5,10-methenyl-THF (De Brouwer et al, 2007). Also, dihydrofolate is partly converted to folic acid or degraded. Values are in nmol folates or MTX per gram of fresh weight. Data are means of three biological replicates and SD. nd, not detected.

**A - Cells used for transcriptomic studies**

Treatment	Time	THF + 5,10-methylene-THF	5-methyl-THF	5-formyl-THF	10-formyl-folic acid	5,10-methenyl-THF	Folic acid	Total	MTX
Control	2 h	6.61 $\pm$ 0.38	2.38 $\pm$ 0.33	0.52 $\pm$ 0.16	nd	2.83 $\pm$ 1.22	0.03 $\pm$ 0.01	12.36 $\pm$ 2.10	nd
	6 h	7.67 $\pm$ 0.27	2.43 $\pm$ 0.46	0.58 $\pm$ 0.24	nd	2.52 $\pm$ 1.27	0.03 $\pm$ 0.01	13.23 $\pm$ 2.25	nd
	24 h	6.13 $\pm$ 1.24	2.20 $\pm$ 0.36	0.47 $\pm$ 0.27	nd	2.49 $\pm$ 1.24	0.02 $\pm$ 0.01	11.32 $\pm$ 3.11	nd
+ MTX	2 h	5.26 $\pm$ 1.28	0.92 $\pm$ 0.36	0.32 $\pm$ 0.10	0.07 $\pm$ 0.01	2.43 $\pm$ 0.90	0.67 $\pm$ 0.14	9.67 $\pm$ 2.80	5.72 $\pm$ 0.90
	6 h	3.36 $\pm$ 1.78	0.14 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.02	1.40 $\pm$ 0.53	0.49 $\pm$ 0.05	5.77 $\pm$ 2.69	9.47 $\pm$ 1.04
	24 h	1.79 $\pm$ 0.43	0.01 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.19	0.27 $\pm$ 0.04	2.60 $\pm$ 0.69	8.51 $\pm$ 0.82

**B - Cells used for rescue experiments**

Treatment	Time	THF + 5,10-methylene-THF	5-methyl-THF	5-formyl-THF	10-formyl-folic acid	5,10-methenyl-THF	Folic acid	Total	MTX
Control	6 h	3.67 $\pm$ 0.93	6.38 $\pm$ 0.60	1.84 $\pm$ 0.38	0.03 $\pm$ 0.02	5.40 $\pm$ 0.70	0.01 $\pm$ 0.00	17.32 $\pm$ 2.63	nd
	12 h	2.91 $\pm$ 0.76	6.33 $\pm$ 0.76	2.03 $\pm$ 0.44	0.17 $\pm$ 0.19	6.05 $\pm$ 1.31	0.01 $\pm$ 0.00	17.50 $\pm$ 3.47	nd
	24 h	2.09 $\pm$ 0.30	7.22 $\pm$ 1.20	2.19 $\pm$ 0.73	0.34 $\pm$ 0.07	6.09 $\pm$ 0.32	0.03 $\pm$ 0.01	17.96 $\pm$ 2.63	nd
+ MTX	6 h	1.76 $\pm$ 0.39	2.00 $\pm$ 0.43	0.61 $\pm$ 0.15	0.11 $\pm$ 0.07	1.59 $\pm$ 0.53	0.66 $\pm$ 0.06	6.73 $\pm$ 1.62	8.23 $\pm$ 1.60
	12 h	0.57 $\pm$ 0.24	0.53 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.21	0.45 $\pm$ 0.07	2.54 $\pm$ 0.73	10.26 $\pm$ 3.15
	24 h	0.33 $\pm$ 0.15	0.13 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.06	1.30 $\pm$ 0.35	11.05 $\pm$ 1.86
+ MTX + LV	6 h	2.26 $\pm$ 0.68	3.74 $\pm$ 0.63	6.58 $\pm$ 1.70	0.36 $\pm$ 0.12	2.07 $\pm$ 0.66	0.84 $\pm$ 0.19	15.86 $\pm$ 3.98	9.00 $\pm$ 0.70
	12 h	1.58 $\pm$ 0.36	2.37 $\pm$ 0.77	12.58 $\pm$ 0.93	0.20 $\pm$ 0.22	3.38 $\pm$ 0.38	0.69 $\pm$ 0.05	20.79 $\pm$ 2.70	16.17 $\pm$ 0.28
	24 h	1.16 $\pm$ 0.12	2.86 $\pm$ 0.42	16.83 $\pm$ 0.58	0.09 $\pm$ 0.06	1.10 $\pm$ 0.47	0.58 $\pm$ 0.04	22.63 $\pm$ 1.68	20.60 $\pm$ 1.44
+ LV	6 h	5.25 $\pm$ 0.99	7.45 $\pm$ 0.34	11.12 $\pm$ 1.17	0.05 $\pm$ 0.02	7.58 $\pm$ 0.78	0.02 $\pm$ 0.01	31.47 $\pm$ 3.30	nd
	12 h	4.25 $\pm$ 1.04	11.59 $\pm$ 3.38	15.35 $\pm$ 0.69	0.52 $\pm$ 0.73	10.14 $\pm$ 2.50	0.05 $\pm$ 0.02	41.90 $\pm$ 8.35	nd
	24 h	4.65 $\pm$ 2.31	12.07 $\pm$ 2.27	26.46 $\pm$ 3.05	0.45 $\pm$ 0.28	12.31 $\pm$ 4.96	0.10 $\pm$ 0.03	56.04 $\pm$ 12.90	nd

**Supplemental Table S2. Validation of the microarray data by quantitative RT-PCR.**

Microarray data were obtained from comparisons between MTX-treated and control cells after 2, 6, and 24h of treatment (see Fig. 2). A statistical cut-off  $P < 0.05$  after Bonferroni correction was used to determine which genes were differentially expressed in response to MTX. The average ratio (MTX vs. control transcript levels) and  $P$ -value for 2 independent biological repeats of the experiment is shown. Real-time qPCR was done as described in the Materials and methods section. Values  $\pm$  SD correspond to relative transcript levels in treated vs. control cells, as determined for 3 biological repeats.

Accession number	Gene description	Gene name	Microarray data						Quantitative RT-PCR		
			MTX / control 2h		MTX / control 6h		MTX / control 24h		MTX / control 2h	MTX / control 6h	MTX / control 24h
			Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio	P-value	Ratio $\pm$ SD	Ratio $\pm$ SD	Ratio $\pm$ SD
AT1G19770	purine permease	PUP 14	0.93	1.00E+00	14.37	0.00E+00	1.00	1.00E+00	1.33 $\pm$ 0.21	27.65 $\pm$ 4.31	2.02 $\pm$ 0.37
AT1G36370	serine hydroxymethyltransferase (plastidial)	cpSHMT	0.94	1.00E+00	8.21	0.00E+00	1.49	1.00E+00	1.21 $\pm$ 0.20	8.85 $\pm$ 1.23	4.73 $\pm$ 0.90
AT1G50480	10-formyltetrahydrofolate synthetase	FTHFS	1.21	1.00E+00	8.42	0.00E+00	1.74	1.13E-02	1.31 $\pm$ 0.20	4.3 $\pm$ 0.52	1.69 $\pm$ 0.19
AT1G74590	glutathione transferase	GSTU10	1.04	1.00E+00	3.06	0.00E+00	8.26	0.00E+00	1.16 $\pm$ 0.75	3.00 $\pm$ 0.70	16.70 $\pm$ 1.71
AT3G02470	S-adenosylmethionine decarboxylase	SAMdc	1.26	1.00E+00	4.34	0.00E+00	7.24	0.00E+00	1.39 $\pm$ 0.17	2.18 $\pm$ 0.25	11.89 $\pm$ 2.86
AT3G22370	alternative oxidase 1a	AOX1a	1.07	1.00E+00	18.62	0.00E+00	11.82	0.00E+00	1.04 $\pm$ 0.21	28.82 $\pm$ 5.62	16.59 $\pm$ 3.57
AT3G23810	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	SAHH2	1.08	1.00E+00	0.77	1.00E+00	0.31	0.00E+00	1.38 $\pm$ 0.44	1.02 $\pm$ 0.19	0.59 $\pm$ 0.16
AT3G55630	folypolyglutamate synthetase (cytosolic)	FPGSD	1.00	1.00E+00	2.49	0.00E+00	0.57	1.09E-02	1.23 $\pm$ 0.22	4.93 $\pm$ 0.31	0.90 $\pm$ 0.27
AT4G04610	5'-adenylylsulfate reductase	APR1	0.98	1.00E+00	19.83	0.00E+00	3.17	0.00E+00	2.24 $\pm$ 0.48	28.28 $\pm$ 9.55	5.21 $\pm$ 2.48
AT4G37930	serine hydroxymethyltransferase (mitochondrial)	mtSHMT	0.96	1.00E+00	0.75	1.00E+00	0.28	0.00E+00	1.00 $\pm$ 0.15	1.08 $\pm$ 0.28	0.49 $\pm$ 0.08
AT5G10180	sulfate transporter	SULTR2.1	0.92	1.00E+00	1.48	1.00E+00	0.39	0.00E+00	0.94 $\pm$ 0.09	2.16 $\pm$ 0.40	0.35 $\pm$ 0.02
AT5G17920	vitamin-B12-independent methionine synthase	MS1	1.03	1.00E+00	1.11	1.00E+00	0.48	8.71E-07	0.79 $\pm$ 0.17	1.13 $\pm$ 0.32	0.51 $\pm$ 0.06

### Supplemental Table S3. Selected MTX-responsive genes that may be involved in the regulation of cell cycle and response to stress.

Microarray data are expressed in log<sub>2</sub>(ratio) obtained from comparisons between MTX-treated and control cells after 2, 6, and 24h of treatment (see Fig. 2). A statistical cut-off  $P < 0.05$  after Bonferroni correction was used to determine which genes were differentially expressed in response to MTX. Positive (red boxes) and negative (green boxes) ratio indicate that the genes are induced or repressed by MTX, respectively. The average log<sub>2</sub>(ratio) and P-value for 2 independent biological repeats of the experiment is shown.

Accession number	Gene description	MTX / control 2h		MTX / control 6h		MTX / control 24h	
		log <sub>2</sub> (ratio)	P-value	log <sub>2</sub> (ratio)	P-value	log <sub>2</sub> (ratio)	P-value
<b>Cell cycle</b>							
AT1G76540	CDKB2;1; kinase_ cell division control protein, putative	-0.03	1.00E+0	-0.32	1.00E+0	-1.60	0.00E+0
AT2G27960	CKS1; cyclin-dependent protein kinase_ cyclin-dependent kinase / CDK (CKS1)	0.04	1.00E+0	-1.61	0.00E+0	-1.56	0.00E+0
AT2G27970	CKS2; cyclin-dependent protein kinase_ cyclin-dependent kinase, putative / CDK, putative	0.10	1.00E+0	-0.96	1.74E-7	-2.26	0.00E+0
AT1G44110	CYCA1;1; cyclin-dependent protein kinase regulator	0.11	1.00E+0	-0.12	1.00E+0	-1.98	0.00E+0
AT2G26760	CYCB1;4 (CYCLIN 3); cyclin-dependent protein kinase regulator	0.03	1.00E+0	-0.12	1.00E+0	-2.14	0.00E+0
AT2G17620	CYCB2;1; cyclin-dependent protein kinase regulator	-0.13	1.00E+0	-0.36	1.00E+0	-1.11	6.37E-8
AT5G03455	CDC25_ rhodanese-like domain-containing protein	0.06	1.00E+0	-1.44	0.00E+0	-0.84	3.41E-3
AT5G42190	ASK2 (ARABIDOPSIS SKP1-LIKE 2); ubiquitin-protein ligase_ E3 ubiquitin ligase SCF complex subunit SKP1/ASK1	-0.10	1.00E+0	0.39	1.00E+0	-1.50	0.00E+0
AT1G75950	SKP1 ; ubiquitin-protein ligase_ E3 ubiquitin ligase SCF complex subunit SKP1/ASK1	0.10	1.00E+0	-1.15	5.62E-12	-0.05	1.00E+0
AT1G07370	PCNA1 (PROLIFERATING CELLULAR NUCLEAR ANTIGEN)	0.10	1.00E+0	-0.54	1.00E+0	-1.65	0.00E+0
AT2G30410	KIS (KIESEL); unfolded protein binding_ tubulin folding cofactor A (KIESEL)	0.01	1.00E+0	-1.08	3.49E-10	-1.72	0.00E+0
AT5G23860	TUB8_ tubulin beta-8 chain (TUB8) (TUBB8)	0.06	1.00E+0	-0.84	5.31E-5	-1.42	0.00E+0
AT5G12250	TUB6 (BETA-6 TUBULIN)_ tubulin beta-6 chain (TUB6)	0.00	1.00E+0	-0.70	1.49E-2	-1.56	0.00E+0
AT4G14960	TUA6_ tubulin alpha-6 chain (TUA6)	-0.01	1.00E+0	0.10	1.00E+0	-2.76	0.00E+0
AT4G20890	TUB9; GTP binding / GTPase/ structural molecule_ tubulin beta-9 chain (TUB9)	0.01	1.00E+0	-0.42	1.00E+0	-1.22E-7	1.22E-7
AT2G29550	TUB7_ tubulin beta-7 chain (TUB7)	0.02	1.00E+0	-0.55	1.00E+0	-3.32	0.00E+0
AT1G04820	TUA4_ tubulin alpha-2/alpha-4 chain (TUA4)	0.07	1.00E+0	-0.18	1.00E+0	-3.99	0.00E+0
AT1G50010	TUA2 unknown protein	0.04	1.00E+0	-0.20	1.00E+0	-3.58	0.00E+0
<b>Alternative oxidases</b>							
AT1G32350	alternative oxidase 1d (AOX1D)	0.10	1.00E+0	0.89	4.20E-6	1.49	0.00E+0
AT3G22370	alternative oxidase 1a (AOX1A)	0.10	1.00E+0	4.22	0.00E+0	3.56	0.00E+0
<b>Ethylene and polyamine metabolism</b>							
AT4G26200	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, putative / ACC synthase 7 (ACS7)	0.13	1.00E+0	3.77	0.00E+0	2.61	0.00E+0
AT1G01480	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2 / ACC synthase 2 (ACS2)	0.09	1.00E+0	3.59	0.00E+0	2.73	0.00E+0
AT1G62380	1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase (ACO2)	0.11	1.00E+0	-1.10	1.24E-10	-1.36	0.00E+0
AT2G25450	1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase	-0.10	1.00E+0	0.46	1.00E+0	2.22	0.00E+0
AT5G43450	1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase	-0.01	1.00E+0	2.93	0.00E+0	1.42	0.00E+0
AT1G05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase (EFE)	0.03	1.00E+0	1.57	0.00E+0	0.73	9.26E-2
AT3G45410	Ethylene receptor	0.08	1.00E+0	1.29	0.00E+0	0.95	4.99E-5
AT5G15950	S-adenosylmethionine decarboxylase	-0.06	1.00E+0	0.56	1.00E+0	1.69	0.00E+0
AT3G02470	S-adenosylmethionine decarboxylase	0.34	1.00E+0	2.12	0.00E+0	2.86	0.00E+0
AT2G16500	arginine decarboxylase (ADC1)	0.35	1.00E+0	1.02	7.13E-9	1.51	0.00E+0
AT4G34710	arginine decarboxylase (ADC2)	0.20	1.00E+0	-0.32	1.00E+0	1.14	1.89E-8
<b>Cytochrome P450 family</b>							
AT5G42580	a member of the cytochrome P450 family	0.10	1.00E+0	-1.08	2.81E-10	-0.01	1.00E+0
AT5G45340	CYP707A3; heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	-0.06	1.00E+0	1.37	0.00E+0	-0.46	1.00E+0
AT2G34500	CYP710A1; heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	-0.11	1.00E+0	-0.52	1.00E+0	2.22	0.00E+0
AT2G34490	CYP710A2; heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	0.10	1.00E+0	-1.51	0.00E+0	-1.16	6.82E-9
AT4G39950	CYP79B2; heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen binding	-0.11	1.00E+0	0.67	4.66E-2	2.44	0.00E+0

AT2G24180	cytochrome P450 monooxygenase	0.09	1.00E+0	1.19	0.00E+0	1.46	0.00E+0
AT1G64900	cytochrome P450 (CYP89A2).	-0.18	1.00E+0	0.58	8.12E-1	1.33	0.00E+0
AT4G30210	NADPH-cytochrome P450 reductase	-0.12	1.00E+0	1.74	0.00E+0	-0.57	1.00E+0
AT2G45510	member of CYP704A	-0.01	1.00E+0	-0.83	6.90E-5	-1.05	1.06E-6
AT3G20960	member of CYP705A	-0.08	1.00E+0	0.27	1.00E+0	1.10	1.00E-7
AT4G27710	member of CYP709B	-0.09	1.00E+0	1.07	5.17E-10	0.26	1.00E+0
AT4G37320	member of CYP81D	-0.10	1.00E+0	1.14	5.62E-12	0.22	1.00E+0
AT5G57220	member of CYP81F	-0.05	1.00E+0	2.88	0.00E+0	0.59	1.00E+0
AT4G31500	oxime-metabolizing enzyme	-0.06	1.00E+0	1.32	0.00E+0	-1.19	1.36E-9

#### Glutathione S-transferases

AT1G69930	glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs	-0.09	1.00E+0	2.72	0.00E+0	3.70	0.00E+0
AT1G74590	glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs	0.05	1.00E+0	1.62	0.00E+0	3.05	0.00E+0
AT4G02520	glutathione transferase belonging to the phi class of GSTs.	0.01	1.00E+0	1.42	0.00E+0	3.34	0.00E+0
AT1G78370	glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs	0.02	1.00E+0	1.34	0.00E+0	0.66	8.69E-1
AT2G47730	glutathione transferase belonging to the phi class of GSTs	0.01	1.00E+0	1.02	7.35E-9	0.50	1.00E+0
AT2G29420	glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs	0.05	1.00E+0	0.65	8.71E-2	1.51	0.00E+0
AT3G09270	glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs	-0.07	1.00E+0	0.59	5.95E-1	1.82	0.00E+0
AT1G78380	glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs	-0.04	1.00E+0	0.02	1.00E+0	1.53	0.00E+0
AT1G17190	glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs	-0.01	1.00E+0	-1.11	4.50E-11	-1.26	5.04E-11

#### Glucosyl- and sulfo-transferases

AT2G28080	glycosyltransferase family protein	0.15	1.00E+0	0.65	8.96E-2	1.60	0.00E+0
AT1G05670	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	0.06	1.00E+0	3.08	0.00E+0	3.50	0.00E+0
AT5G12890	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	0.13	1.00E+0	1.89	0.00E+0	1.17	4.03E-9
AT1G07240	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0.03	1.00E+0	1.74	0.00E+0	1.25	7.85E-11
AT1G07260	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0.10	1.00E+0	0.59	6.73E-1	1.08	2.68E-7
AT3G11340	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	-0.29	1.00E+0	0.52	1.00E+0	3.32	0.00E+0
AT3G21800	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	0.00	1.00E+0	0.16	1.00E+0	1.33	0.00E+0
AT2G30140	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	0.04	1.00E+0	-0.10	1.00E+0	1.34	0.00E+0
AT3G21780	UDP-glucosyl transferase	-0.02	1.00E+0	0.33	1.00E+0	1.55	0.00E+0
AT2G15490	UGT73B4; UDP-glycosyltransferase	-0.28	1.00E+0	3.31	0.00E+0	3.03	0.00E+0
AT1G74100	sulfotransferase family protein	-0.10	1.00E+0	1.40	0.00E+0	0.62	1.00E+0
AT2G03760	High similarity to flavonol sulfotransferases (FSTs)	0.08	1.00E+0	-0.39	1.00E+0	5.31	0.00E+0

#### ABC transporters and MATE efflux proteins

AT1G30400	MRP1, glutathione S-conjugate transporting ATPase (tonoplast)	0.03	1.00E+0	-0.28	1.00E+0	-0.02	1.00E+0
AT2G47800	MRP4, ATPase transporter, multidrug transport (plasma membrane)	0.05	1.00E+0	-0.07	1.00E+0	0.15	1.00E+0
AT3G62150	MDR17 multidrug resistance transporter	0.02	1.00E+0	1.14	1.12E-11	0.07	1.00E+0
AT2G47000	MDR4 multidrug resistance transporter	0.01	1.00E+0	1.96	0.00E+0	0.55	1.00E+0
AT1G02520	MDR8 multidrug resistance transporter	-0.08	1.00E+0	2.88	0.00E+0	1.09	1.51E-7
AT2G34660	MRP2 multidrug resistance protein	0.09	1.00E+0	-0.21	1.00E+0	1.11	7.47E-8
AT3G13080	MRP3 multidrug resistance protein	-	-	1.36	0.00E+0	0.86	1.60E-3
AT1G04120	MRP5 multidrug resistance protein	0.06	1.00E+0	-0.45	1.00E+0	-1.02	3.01E+6
AT2G37280	PDR5 pleiotropic drug resistance	0.09	1.00E+0	-0.17	1.00E+0	-1.66	0.00E+0
AT1G59870	PDR8 pleiotropic drug resistance	0.18	1.00E+0	2.19	0.00E+0	0.62	1.00E+0
AT5G39040	TAP2 transporter antigen processing	-0.10	1.00E+0	0.85	2.85E-5	2.21	0.00E+0
AT3G25620	WBC21 white-brown complex homolog	0.08	1.00E+0	0.28	1.00E+0	1.01	4.96E-6
AT3G52310	WBC28 white-brown complex homolog	0.05	1.00E+0	2.29	0.00E+0	-2.07	0.00E+0
AT2G38330	antiporter/ drug transporter/ transporter DNA binding / transcription factor	-0.10	1.00E+0	0.91	1.94E-6	1.18	2.70E-9
AT1G61890	antiporter/ drug transporter/ transporter_ MATE efflux family protein	0.07	1.00E+0	2.68	0.00E+0	0.08	1.00E+0
AT2G04100	antiporter/ drug transporter/ transporter_ MATE efflux family protein	0.04	1.00E+0	1.83	0.00E+0	-0.03	1.00E+0
AT1G71140	antiporter/ drug transporter/ transporter_ MATE efflux family protein	0.04	1.00E+0	0.05	1.00E+0	2.93	0.00E+0
AT4G39030	EDS5 enhanced disease susceptibility protein 5	-0.04	1.00E+0	1.69	0.00E+0	3.58	0.00E+0
AT1G58340	ZF14; antiporter/ drug transporter/ transporter_ MATE efflux protein-related	-0.05	1.00E+0	0.22	1.00E+0	1.33	0.00E+0

## Supplemental Table S4. Expression of genes associated with C1-metabolism in Arabidopsis cells treated with MTX

Microarray data are expressed in log<sub>2</sub>(ratio) obtained from comparisons between MTX-treated and control cells after 2, 6, and 24h of treatment (see Fig. 2). A statistical cut-off  $P < 0.05$  after Bonferroni correction was used to determine which genes were differentially expressed in response to MTX. Positive (red boxes) and negative (green boxes) ratio indicate that the genes are induced or repressed by MTX, respectively. The average log<sub>2</sub>(ratio) and P-value for 2 independent biological repeats of the experiment is shown.

Accession number	Gene name	Gene description	MTX / control 2h		MTX / control 6h		MTX / control 24h	
			log <sub>2</sub> (ratio)	P-value	log <sub>2</sub> (ratio)	P-value	log <sub>2</sub> (ratio)	P-value
<b>THF synthesis, degradation and recycling</b>								
AT2G28880	ADCS	ADC synthase	-0.11	1.00E+0	0.03	1.00E+0	0.13	1.00E+0
AT5G57850	ADCL	ADC lyase	0.05	1.00E+0	-0.10	1.00E+0	0.07	1.00E+0
AT3G07270	GTPCHI	GTP cyclohydrolase I	0.10	1.00E+0	0.45	1.00E+0	0.37	1.00E+0
AT3G11750	DHNA1	Dihydroneopterin aldolase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT5G62980	DHNA2	Dihydroneopterin aldolase	0.03	1.00E+0	-0.06	1.00E+0	0.28	1.00E+0
AT3G21730	DHNA3	Dihydroneopterin aldolase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT4G30000	HPPK-DHPS 1	Dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase	0.07	1.00E+0	0.03	1.00E+0	-0.04	1.00E+0
AT1G69190	HPPK-DHPS 2	Dihydropterin pyrophosphokinase-dihydropteroate synthase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT5G41480	DHFS	Dihydrofolate synthetase	-0.01	1.00E+0	0.05	1.00E+0	-0.09	1.00E+0
AT2G16370	DHFR-TS 1	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (thy1)	0.25	1.00E+0	0.11	1.00E+0	0.27	1.00E+0
AT2G21550	DHFR-TS 3	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	0.02	1.00E+0	0.30	1.00E+0	0.08	1.00E+0
AT4G34570	DHFR-TS 2	Dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (thy2)	0.04	1.00E+0	-0.07	1.00E+0	-0.05	1.00E+0
AT5G05980	FPGS B	Folypolyglutamate synthetase	0.07	1.00E+0	-0.25	1.00E+0	-0.40	1.00E+0
AT3G10160	FPGS C	Folypolyglutamate synthetase	-0.01	1.00E+0	-0.83	6.79E-5	-0.30	1.00E+0
AT3G55630	FPGS D	Folypolyglutamate synthetase	0.00	1.00E+0	1.32	0.00E+0	-0.80	1.09E-2
AT1G78680	GGH1	Gamma-glutamyl hydrolase	0.05	1.00E+0	0.17	1.00E+0	0.34	1.00E+0
AT1G78660	GGH2	Gamma-glutamyl hydrolase	0.05	1.00E+0	0.38	1.00E+0	0.03	1.00E+0
AT1G78670	GGH3	Gamma-glutamyl hydrolase	0.15	1.00E+0	0.28	1.00E+0	0.23	1.00E+0
AT1G10310		Pterin reductase	-0.16	1.00E+0	-0.26	1.00E+0	-0.27	1.00E+0
<b>Synthesis and interconversion of C1-THF</b>								
AT1G50480	FTHFS	10-formyl THF synthetase	0.28	1.00E+0	3.07	0.00E+0	0.80	1.13E-2
AT5G13050	5FCL	5-formyl THF cycloligase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT2G38660	DECY1	Methylene THF dehydrogenase / methenyl THF cyclohydrolase	0.01	1.00E+0	-0.38	1.00E+0	-0.42	1.00E+0
AT4G00620	DECY2	Methylene THF dehydrogenase / methenyl THF cyclohydrolase	0.07	1.00E+0	-0.89	1.85E-2	-0.68	4.89E-1
AT3G12290	DECY3	Methylene THF dehydrogenase / methenyl THF cyclohydrolase	0.03	1.00E+0	0.17	1.00E+0	-0.04	1.00E+0
AT4G00600	DECY4	Methylene THF dehydrogenase / methenyl THF cyclohydrolase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT3G59970	MTHFR 1	Methylene THF reductase	-0.01	1.00E+0	-0.26	1.00E+0	-1.12	4.04E-8
AT2G44160	MTHFR 2	Methylene THF reductase	0.08	1.00E+0	0.01	1.00E+0	-1.62	0.00E+0
AT4G17360	FTHFD1	10-formyl THF deformylase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT5G47435	FTHFD2	10-formyl THF deformylase	-0.03	1.00E+0	0.07	1.00E+0	-0.04	1.00E+0
AT1G66520	PDE194	formyltetrahydrofolate deformylase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT4G17360		formyltetrahydrofolate deformylase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT5G47435		formyltetrahydrofolate deformylase	-0.03	1.00E+0	0.07	1.00E+0	-0.04	1.00E+0
AT4G37930	SHMTmt1	Serine hydroxymethyltransferase	-0.06	1.00E+0	-0.41	1.00E+0	-1.86	0.00E+0
AT5G26780	SHMTmt2	Serine hydroxymethyltransferase	0.05	1.00E+0	-0.51	1.00E+0	-0.42	1.00E+0
AT4G32520	SHMTcp1	Serine hydroxymethyltransferase	0.07	1.00E+0	-0.36	1.00E+0	0.27	1.00E+0
AT4G13930	SHMTcy1	Serine hydroxymethyltransferase	0.13	1.00E+0	-0.48	1.00E+0	-0.14	1.00E+0
AT4G13890	SHMTcy2	Serine hydroxymethyltransferase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT1G36370	SHMTcp2	Serine hydroxymethyltransferase	-0.09	1.00E+0	3.04	0.00E+0	0.57	1.00E+0
AT1G22020	SHMTcy3	Serine hydroxymethyltransferase	0.09	1.00E+0	0.03	1.00E+0	0.11	1.00E+0
AT2G26080	P	Glycine decarboxylase - P protein	-0.02	1.00E+0	0.64	1.14E-1	0.00	1.00E+0
AT4G33010	P	Glycine decarboxylase - P protein	0.06	1.00E+0	-0.14	1.00E+0	-1.14	1.55E-8
AT1G11860	T	Glycine decarboxylase - T protein	0.15	1.00E+0	-0.27	1.00E+0	-1.43	0.00E+0

AT1G60990	T	Glycine decarboxylase - T protein	0.00	1.00E+0	0.23	1.00E+0	-0.45	1.00E+0
AT1G48030	L (LPD1)	Glycine decarboxylase - L protein	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT3G17240	L (LPD2)	Glycine decarboxylase - L protein	0.13	1.00E+0	0.13	1.00E+0	-0.06	1.00E+0
AT3G16950	L	Glycine decarboxylase - L protein	0.15	1.00E+0	-0.19	1.00E+0	-0.37	1.00E+0
AT4G16155	L	Glycine decarboxylase - L protein	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT2G35120	H	Glycine decarboxylase - H protein	-0.11	1.00E+0	-0.59	5.17E-6	-1.49	0.00E+0
AT2G35370	H	Glycine decarboxylase - H protein	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT1G32470	H	Glycine decarboxylase - H protein	0.09	1.00E+0	-1.12	3.37E-11	-1.96	0.00E+0
<b>Folate carriers</b>								
AT5G66380	AtFOLT1	Folate transporter (plastids)	0.04	1.00E+0	-0.08	1.00E+0	-0.13	1.00E+0
AT2G32040	FBT1	Folate transporter (plastids)	0.00	1.00E+0	0.29	1.00E+0	0.32	1.00E+0
AT1G30400	AtMRP1	glutathione S-conjugate transporting ATPase (tonoplast)	0.03	1.00E+0	-0.28	1.00E+0	-0.02	1.00E+0
AT2G47800	AtMRP4	ATPase transporter, multidrug transport (plasma membrane)	0.05	1.00E+0	-0.07	1.00E+0	0.15	1.00E+0
<b>Methionine synthesis and recycling</b>								
AT3G01120	CGS1	Cystathionine gamma-synthase	0.08	1.00E+0	0.30	1.00E+0	0.55	1.00E+0
AT3G57050	CBL	Cystathionine beta-lyase	-0.05	1.00E+0	-0.31	1.00E+0	-0.25	1.00E+0
AT5G17920	MS1	Methionine synthase	0.04	1.00E+0	0.14	1.00E+0	-1.05	8.71E-7
AT3G03780	MS2	Methionine synthase	0.04	1.00E+0	-0.36	1.00E+0	-1.19	1.55E-9
AT5G20980	MS3	Methionine synthase	-0.09	1.00E+0	-0.31	1.00E+0	-0.15	1.00E+0
AT1G64660	MGL	Methionine gamma-lyase	0.04	1.00E+0	-0.18	1.00E+0	-1.71	0.00E+0
AT1G66520	FMT	Methionyl-tRNA formyltransferase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT4G01850	SAMS2	S-adenosylmethionine synthetase	-0.08	1.00E+0	-0.92	1.29E-6	-0.05	1.00E+0
AT3G17390	SAMS3	S-adenosylmethionine synthetase	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AT1G02500	SAMS1	S-adenosylmethionine synthetase	-0.10	1.00E+0	-0.17	1.00E+0	-0.65	9.37E-1
AT2G36880	SAMS4	S-adenosylmethionine synthetase	-0.14	1.00E+0	0.77	1.06E-3	-0.71	2.23E-1
AT4G13940	SAHH1	S-adenosylhomocysteine hydrolase	0.07	1.00E+0	-0.10	1.00E+0	-0.40	1.00E+0
AT3G23810	SAHH2	S-adenosylhomocysteine hydrolase	0.11	1.00E+0	-0.37	1.00E+0	-1.71	0.00E+0
AT5G49810	MMT	Methionine S-methyl transferase	0.04	1.00E+0	-0.08	1.00E+0	-1.05	9.33E-7
AT3G25900	HMT1	Homocysteine S-methyltransferase	-0.06	1.00E+0	0.67	4.21E-2	0.40	1.00E+0
AT3G63250	HMT2	Homocysteine S-methyltransferase	0.00	1.00E+0	-0.12	1.00E+0	-0.04	1.00E+0
AT3G22740	HMT3	Homocysteine S-methyltransferase	-0.04	1.00E+0	-0.08	1.00E+0	0.55	1.00E+0
AT3G09820	ADK1	Adenosine kinase	0.00	1.00E+0	-0.01	1.00E+0	0.04	1.00E+0
AT5G03300	ADK2	Adenosine kinase	-0.04	1.00E+0	-0.43	1.00E+0	-2.60	0.00E+0
AT4G39460	SAMT1	S-adenosylmethionine transporter (plastids)	0.01	1.00E+0	0.28	1.00E+0	0.02	1.00E+0
AT1G34065	SAMT2	S-adenosylmethionine transporter (mitochondrial, putative)	0.03	1.00E+0	-0.41	1.00E+0	-0.27	1.00E+0
<b>S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases</b>								
AT1G04870		arginine N-methyltransferase family protein	-0.08	1.00E+0	-0.07	1.00E+0	1.74	0.00E+0
AT1G76090	SMT3	S-adenosyl-methionine-sterol-C-methyltransferase	-0.18	1.00E+0	0.77	8.52E-4	1.63	0.00E+0
AT1G20330	SMT2	sterol-C24-methyltransferase	0.06	1.00E+0	0.89	5.73E-6	1.20	9.14E-10
AT3G26410		methyltransferase/ nucleic acid binding	0.01	1.00E+0	0.49	1.00E+0	1.18	2.28E-9
AT1G64970	G-TMT	gamma-tocopherol methyltransferase (g-TMT)	0.08	1.00E+0	-1.44	0.00E+0	-0.89	4.38E-4
AT5G49020		protein arginine N-methyltransferase family protein	0.00	1.00E+0	-0.55	1.00E+0	-1.32	0.00E+0
AT1G48600		phosphoethanolamine N-methyltransferase 2	-0.03	1.00E+0	-0.34	1.00E+0	-2.19	0.00E+0
AT5G13710	SMT1	SMT1 controls the level of cholesterol in plants	-0.04	1.00E+0	-0.24	1.00E+0	-3.08	0.00E+0
AT3G18000	NMT1	N-methyltransferase-like protein	-0.01	1.00E+0	-0.14	1.00E+0	-3.17	0.00E+0
<b>Other genes coding folate-dependent enzymes</b>								
AT1G31220	GART	Glycinamide ribonucleotide formyltransferase	0.03	1.00E+0	0.16	1.00E+0	-0.01	1.00E+0
AT2G35040	AICART	Aminoimidazole-carboxamide ribonucleotide formyltransferase	0.04	1.00E+0	-0.01	1.00E+0	0.16	1.00E+0
AT2G46110	KPHMT1	Ketopantoate hydroxymethyltransferase	0.15	1.00E+0	-0.08	1.00E+0	-0.08	1.00E+0
AT3G61530	KPHMT2	Ketopantoate hydroxymethyltransferase	0.01	1.00E+0	0.04	1.00E+0	-0.96	4.08E-5



## Supplemental Table S5. Expression of genes involved in the sulfate assimilatory pathway in Arabidopsis cells treated with MTX.

Microarray data are expressed in log<sub>2</sub>(ratio) obtained from comparisons between MTX-treated and control cells after 2, 6, and 24h of treatment (see Fig. 2). A statistical cut-off  $P < 0.05$  after Bonferroni correction was used to determine which genes were differentially expressed in response to MTX. Positive (red boxes) and negative (green boxes) ratio indicate that the genes are induced or repressed by MTX, respectively. The average log<sub>2</sub>(ratio) and P-value for 2 independent biological repeats of the experiment is shown.

Accession number	Gene description	MTX / control 2h		MTX / control 6h		MTX / control 24h	
		log <sub>2</sub> (ratio)	P-value	log <sub>2</sub> (ratio)	P-value	log <sub>2</sub> (ratio)	P-value
<b>Sulfate transporters</b>							
AT1G22150	sulfate transporter (SULTR1.3)	0.05	1.00E+0	0.41	1.00E+0	-0.11	1.00E+0
AT1G23090	sulfate transporter (AST91)	0.05	1.00E+0	0.08	1.00E+0	0.07	1.00E+0
AT1G77990	sulfate transporter (AST56)	0.02	1.00E+0	0.20	1.00E+0	-0.13	1.00E+0
AT1G78000	sulfate transporter (SULTR1.2)	-0.14	1.00E+0	0.43	1.00E+0	0.20	1.00E+0
AT1G80310	sulfate transporter	0.05	1.00E+0	0.90	4.04E-6	-0.19	1.00E+0
AT2G25680	sulfate transporter	0.13	1.00E+0	-0.06	1.00E+0	0.02	1.00E+0
AT3G12520	sulfate transporter (SULTR4.2)	-0.08	1.00E+0	0.08	1.00E+0	-0.02	1.00E+0
AT3G15990	sulfate transporter (SULTR3.4)	0.17	1.00E+0	0.84	4.79E-5	-1.81	0.00E+0
AT3G51895	sulfate transporter (SULTR3.1)	0.01	1.00E+0	0.01	1.00E+0	0.04	1.00E+0
AT4G02700	sulfate transporter (SULTR3.2)	0.11	1.00E+0	0.01	1.00E+0	0.03	1.00E+0
AT4G08620	sulfate transporter (SULTR1.1)	-0.01	1.00E+0	0.07	1.00E+0	-0.09	1.00E+0
AT5G10180	sulfate transporter (SULTR2.1; AST68)	-0.12	1.00E+0	0.56	1.00E+0	-1.36	0.00E+0
AT5G13550	sulfate transporter (SULTR4.1)	0.06	1.00E+0	0.83	9.03E-5	0.55	1.00E+0
AT5G19600	sulfate transporter (SULTR3.5)	0.01	1.00E+0	0.07	1.00E+0	-0.10	1.00E+0
<b>Sulfate activation and reduction</b>							
AT1G19920	ATP sulfurylase (APS2)	0.11	1.00E+0	-0.47	1.00E+0	-1.05	1.05E-6
AT5G43780	ATP sulfurylase (APS4)	-0.08	1.00E+0	-0.39	1.00E+0	-0.46	1.00E+0
AT3G22890	ATP sulfurylase (APS1)	0.10	1.00E+0	2.31	0.00E+0	2.61	0.00E+0
AT4G14680	ATP sulfurylase (APS3)	0.03	1.00E+0	-0.06	1.00E+0	-0.01	1.00E+0
AT1G62180	adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR2)	0.10	1.00E+0	-0.01	1.00E+0	0.88	7.50E-4
AT4G04610	adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR1)	-0.04	1.00E+0	4.31	0.00E+0	1.66	0.00E+0
AT4G21990	adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR3)	0.02	1.00E+0	0.26	1.00E+0	-0.05	1.00E+0
AT5G04590	sulfite reductase	0.03	1.00E+0	0.31	1.00E+0	0.67	6.03E-1
AT2G14750	adenylsulfate kinase (AKN1)	0.05	1.00E+0	0.96	1.48E-7	-0.57	1.00E+0
<b>Cysteine and glutathione biosynthesis</b>							
AT2G43750	O-acetylserine (thiol) lyase (oasB)						
AT3G03630	O-acetylserine (thiol) lyase (CS26)	0.01	1.00E+0	-0.01	1.00E+0	-0.01	1.00E+0
AT3G04940	O-acetylserine (thiol) lyase (CYSD1)	0.03	1.00E+0	-0.49	1.00E+0	-0.90	3.69E-4
AT3G59760	O-acetylserine (thiol) lyase (oasC)	0.05	1.00E+0	0.14	1.00E+0	0.07	1.00E+0
AT3G61440	O-acetylserine (thiol) lyase (CYSC1)	0.25	1.00E+0	0.81	2.19E-4	-0.19	1.00E+0
AT4G14880	O-acetylserine (thiol) lyase (oasA1)	0.18	1.00E+0	0.94	4.15E-7	0.15	1.00E+0
AT5G28020	O-acetylserine (thiol) lyase (CYSD2)	0.04	1.00E+0	-0.06	1.00E+0	0.03	1.00E+0
AT1G55920	serine O-acetyltransferase (SAT2.1)	-0.11	1.00E+0	2.35	0.00E+0	0.96	3.79E-5
AT2G17640	serine O-acetyltransferase (SAT3.1)	0.05	1.00E+0	0.32	1.00E+0	0.20	1.00E+0
AT3G13110	serine O-acetyltransferase (SAT2.2)	0.02	1.00E+0	0.12	1.00E+0	-0.03	1.00E+0
AT4G35640	serine O-acetyltransferase (SAT3.2)	0.03	1.00E+0	0.04	1.00E+0	0.02	1.00E+0
AT5G56760	serine O-acetyltransferase (SAT1.1)	-0.02	1.00E+0	-0.35	1.00E+0	-0.19	1.00E+0
AT5G27380	glutathione synthetase (GSH2)	-0.02	1.00E+0	0.18	1.00E+0	-0.15	1.00E+0
AT4G23100	glutamate-cysteine ligase (GSH1)	-0.12	1.00E+0	0.70	1.56E-2	0.12	1.00E+0

**Supplemental Table S6. Sequences of primers used for qPCR.**

Accession number	Gene description	Gene name	Forward primer	Reverse primer
AT1G19770	purine permease	PUP 14	GGATTCTCGAAAGGGAAAGG	GCGCTTAAGACGGCAGTAAC
AT1G36370	serine hydroxymethyltransferase (plastidial)	cpSHMT	CGAGAAAGTGTGTGAGATGTGCC	CCATGCTCTCTGCAACGC
AT1G50480	10-formyltetrahydrofolate synthetase	FTHFS	GAAGGAAGCGTAGTTTCAGTGAC	TGACCAATAGTAATCTTCTCAAGAACC
AT3G02470	S-adenosylmethionine decarboxylase	SAMdc	CTCCCCTCGTTACAGCATTG	GGAGAGAACGATTGGATCCG
AT3G22370	alternative oxidase 1a	AOX1a	ATGTTCTGCTCCGCTATTG	CCTTTAGTTCACGACCTTGGTAGTG
AT3G23810	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	SAHH2	GACTGGAGCTCTTTGTTCCCTG	CACTATGACACGAGCACCCG
AT3G55630	folylpolyglutamate synthetase (cytosolic)	FPGSD	GAAATTGCTGCAGAGAAAGCC	GAAATGTAGACACAACGCAAC
AT4G04610	5'-adenylylsulfate reductase	APR1	CCAGAAGGAGTTTGCTAAGCAGG	CTAGCAATCTGGAACGAGACGAAG
AT4G37930	serine hydroxymethyltransferase (mitochondrial)	mtSHMT	CTGTCTCCCTGGTCTTCAAGG	GCAATGTGAACAGCTTCCAACAC
AT5G10180	sulfate transporter	SULTR2.1	TGATCAACGTCGATACATCGGG	GCCACCGATTCTGTCGACG
AT1G74590	glutathione transferase	GSTU10	CCCGGTGCACAAGAAGATTCC	GGACATGACTTGACCCATGACCTC
AT5G09810	actin 2/7	ACT2/7	ACATCGTTCTCAGTGGTGGTTC	ACCTGACTCATCGTACTCACTC
AT5G17920	vitamin-B12-independent methionine synthase	MS1	CTGTGGTCTCAAGACCCGT	CCTTGTTCAAATCAAGCTTTTC



## **CHAPITRE II**

---

### **Influence du statut en folates sur la réaction de méthylation impliquée dans la synthèse des chlorophylles**

**C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status**

**New Phytologist. 2009;182(1):137-45.**

Valérie Van Wilder, Veerle De Brouwer, Karen Loizeau, Bernadette Gambonnet, Catherine Albrieux, Dominique Van Der Straeten, Willy E. Lambert, Roland Douce, Maryse A. Block, Fabrice Rebeille and Stéphane Ravanel.



## Chapitre II

## Influence du statut en folates sur la réaction de méthylation impliquée dans la synthèse des chlorophylles

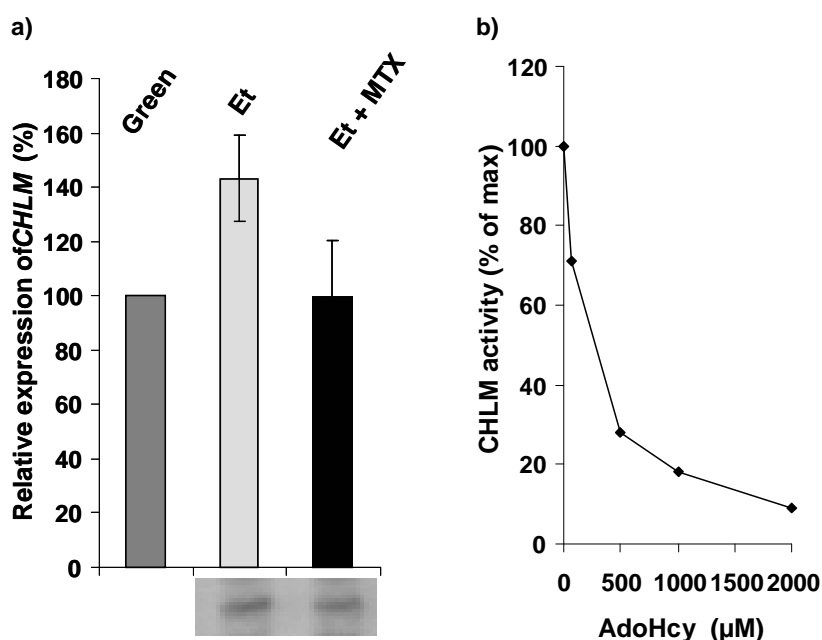
Dans l'article précédent, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle un déficit en folate chez *Arabidopsis* se traduit, entre autres, par une diminution des réactions de méthylation. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié le comportement d'une réaction de méthylation particulière dans une situation de limitation en folates. Ce travail, réalisé principalement par Valérie Van Wilder au cours de son stage post-doctoral effectué au laboratoire, s'est focalisé sur la Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase, enzyme impliquée dans la synthèse des chlorophylles.

Dans la synthèse bibliographique de ce manuscrit, nous avons évoqué (§ D-I) le fait que certains gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse du THF présentent des pics d'expression lors de stades particuliers du développement de la plantule. En effet, au cours du développement des feuilles à la lumière, la surexpression des gènes de synthèse de THF s'accompagne d'une augmentation de la teneur en folates et est concomitante à la mise en place de l'appareil photosynthétique et photorespiratoire (Jabrin et al, 2003). Ce phénomène est également observé au cours du processus de dé-étiolement (transition obscurité - lumière). Le lien entre le métabolisme C1 et la biogenèse de l'appareil photosynthétique pourrait se situer au niveau de la synthèse des chlorophylles qui requière une réaction de méthylation catalysée par la Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase (Block et al, 2002).

Dans cette étude, des plantules de pois étiolés ont été traitées au MTX afin d'instaurer un déficit en folates, puis ont été exposées à la lumière. Le processus de dé-étiolement s'accompagne normalement d'une synthèse massive de chlorophylles susceptible de consommer tout le CH<sub>3</sub>-THF cellulaire en quelques minutes (Jabrin et al, 2003). Le suivi de la synthèse des chlorophylles après cette perturbation de l'homéostasie des folates au cours du dé-étiolement a permis d'établir le lien étroit qui existe entre le métabolisme C1 et la biogenèse de l'appareil photosynthétique.

Les dosages de folates réalisés indiquent que le traitement au MTX a pour effet de réduire la teneur en folate d'environ 40 % dans les feuilles de plantules étiochées. Lorsque les plantules déficientes en folates sont exposées à la lumière, la vitesse de synthèse des chlorophylles diminue de 2,5 fois par rapport au contrôle. L'implication d'un phénomène de régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de la Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase a été exclue par des expériences de PCR quantitative et de Western-blot puisque ces dernières ne montrent pas de variation significative de la quantité du transcrit ou de la protéine entre les plantules témoins et traitées (Figure 1). Cependant, il est connu que les méthyltransférases SAM-dépendantes sont fortement inhibées par la S-adénosylhomocystéine (SAH) produite lors des réactions de méthylation et sont sensibles au ratio SAM / SAH, appelé index de méthylation. Or, les dosages de SAM et de SAH réalisés par HPLC indiquent que l'index de méthylation chute de 7 à 1 suite au traitement au MTX. Des mesures d'activité Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase menées *in vitro* montrent que, dans ces conditions, l'activité de l'enzyme est réduite d'environ 3 fois. Ainsi, la forte diminution de la vitesse de

synthèse des chlorophylles dans les feuilles de plantules déficientes en folates est due à une régulation métabolique de la Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase (Figure 1). En l'absence de régulation transcriptionnelle et / ou post-transcriptionnelle affectant le niveau d'enzyme, celle-ci voit son activité fortement diminuée en raison de la modification de l'index de méthylation. Ces résultats montrent ainsi le lien étroit qui existe entre le métabolisme C1 et la synthèse des chlorophylles et illustrent l'importance des processus de régulation qui doivent contrôler le pool de folates à certains moments clé du développement de la plante. La relation forte entre homéostasie en folates et contrôle de l'activité des méthyltransférases existe vraisemblablement pour d'autres réactions de méthylation essentielles au développement de la plante, toutes les méthyltransférases connues étant sensibles à des fluctuations de l'index de méthylation (Moffatt et Weretilnyk, 2001).



**Figure 1 : Expression et activité de la Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase (CHLM).**

**a)** Expression de la CHLM mesurée par PCR quantitative sur des feuilles de pois vertes, étiolées (Et) ou étiolées / traitées au MTX (Et + MTX) et quantité d'enzyme correspondante analysée par western-blot.

**b)** Effet de l'index de méthylation sur l'activité de la CHLM. Un extrait d'enveloppe de plastes d'épinard (40 μg de protéines) est incubé 30 min en présence de 500 μM de SAM, 40 μM de CHLM et d'une concentration variable d'adénylhomocystéine (AdoHcy).

# C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status

Valérie Van Wilder<sup>1</sup>, Veerle De Brouwer<sup>2</sup>, Karen Loizeau<sup>1</sup>, Bernadette Gambonnet<sup>1</sup>, Catherine Albricieux<sup>1</sup>, Dominique Van Der Straeten<sup>3</sup>, Willy E. Lambert<sup>2</sup>, Roland Douce<sup>1</sup>, Maryse A. Block<sup>1</sup>, Fabrice Rebeille<sup>1</sup> and Stéphane Ravanel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, UMR5168 CNRS-CEA-INRA-Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France; <sup>2</sup>Laboratory of Toxicology, Ghent University, Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent, Belgium; <sup>3</sup>Unit Plant Hormone Signaling and Bioimaging, Department of Molecular Genetics, Ghent University, Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent, Belgium

## Summary

Author for correspondence:

F. Rebeille

Tel: +33 4 38 78 44 93

Fax: +33 4 38 78 50 91

Email: frebeille@cea.fr

Received: 19 September 2008

Accepted: 27 October 2008

*New Phytologist* (2009) **182**: 137–145  
doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02707.x

**Key words:** C1 metabolism, chlorophyll synthesis, folate, methylation index, Mg-protoporphyrin IX methyl transferase, pea (*Pisum sativum*).

- Tetrahydrofolate derivatives are central cofactors of C1 metabolism. Using methotrexate as a specific inhibitor of folate biosynthesis, we altered the folate status in 10-d-old etiolated pea (*Pisum sativum*) leaves and followed the rate of chlorophyll synthesis upon illumination.
- In our conditions, the folate concentration decreased only from 5.7 to 4.2 nmol g<sup>-1</sup> FW, but the amount of chlorophyll after 24 h of illumination was reduced 2.5 times. Folate status and rate of chlorophyll synthesis were apparently correlated through the methyl cycle.
- Indeed, we observed that methyl-tetrahydrofolate was the folate derivative most affected by the treatment; the decrease of methyl-tetrahydrofolate was associated with a sharp rise in homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations, which are normally maintained at very low values, shifting the methylation index (S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine ratio) from 7 to 1; the decrease of the methylation index reduced by a factor of 3 the activity of the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase (CHLM), an essential enzyme for chlorophyll synthesis. *CHLM* gene expression and protein concentration remained unchanged, suggesting that this inhibition relied essentially on metabolic regulation.
- These results point out that an even moderate change in the folate status may affect plant development and adaptation.

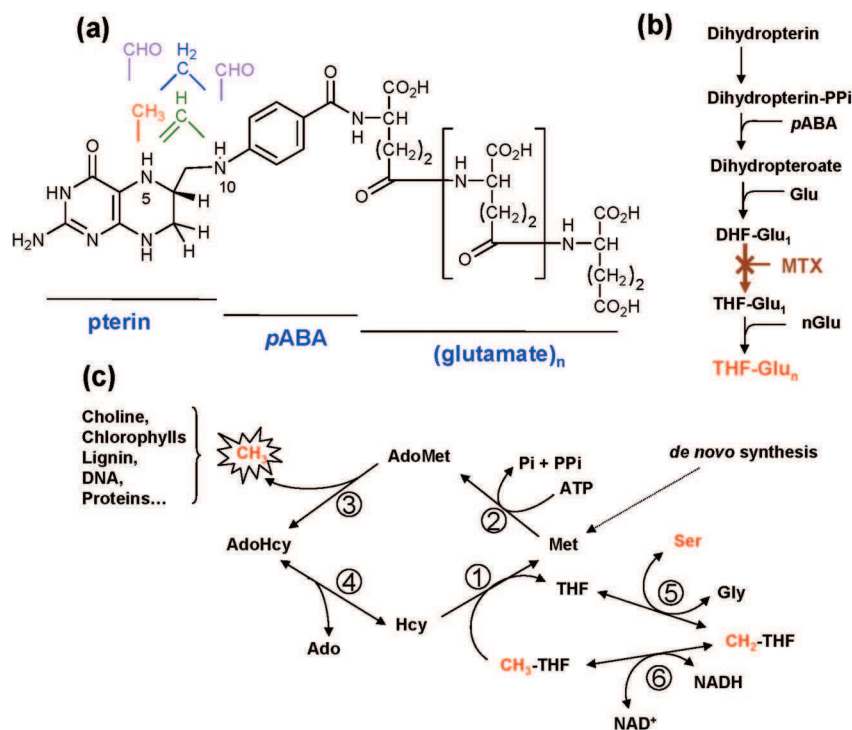
## Introduction

'Folate' (vitamin B9) is a generic term representing a family of molecules deriving from tetrahydrofolate (THF). They are essential cofactors, required in the transfer of C1 units from one molecule to another (Basset *et al.*, 2005; Storozhenko *et al.*, 2005; Rebeille *et al.*, 2006). The members of the folate family differ depending on the transported C1 unit (methyl, methylene, methenyl or formyl), the degree of oxidation of the pterin moiety (dihydro or tetrahydro), and the length of the glutamate chain (Fig. 1a). The synthesis of THF is the target of various antibiotics, including methotrexate (MTX)

that specifically inhibits dihydrofolate reductase (Fig. 1b). Depending on the transported C1 unit, they are involved in various biosynthetic pathways, including those for purines, thymidylate and methionine (Met) (Rebeille *et al.*, 2007). Since Met is the source of S-adenosylmethionine (AdoMet), the universal methyl donor, folate cofactors are at the basis of almost all C1 transfer reactions, also called C1 metabolism (Hanson & Roje, 2001; Ravanel *et al.*, 2004b).

Although the various plant organs/tissues are probably autonomous for THF synthesis, folate is not equally distributed in the various parts of the plant. Indeed, high amounts of folate are found in cells from embryonic or proliferating tissues,





**Fig. 1** The tetrahydrofolate (THF) molecule and the methyl cycle. (a) Structure of the THF molecule, showing the possible substitutions at the N5 and/or N10 positions by the various C1-units. Although the number of glutamate residues may fluctuate widely, THF usually contains five to six glutamate residues. CH<sub>3</sub>-THF, methyl tetrahydrofolate; CH<sub>2</sub>-THF, methylene tetrahydrofolate; CH-THF, methenyl tetrahydrofolate; CHO-THF, formyl tetrahydrofolate. (b) Synthesis of THF from dihydropterin. The conversion of dihydrofolate (DHF) into THF is catalysed by dihydrofolate reductase, the target of methotrexate (MTX). pABA, para-aminobenzoic acid; DHF-Glu<sub>1</sub>, dihydrofolate with one glutamate; THF-Glu<sub>1</sub>, tetrahydrofolate with one glutamate; THF-Glu<sub>n</sub>, tetrahydrofolate with n glutamates. (c) Overview of the reactions involved in the methyl cycle: 1, methionine synthase; 2, S-adenosylmethionine synthetase; 3, methyltransferases; 4, S-adenosylhomocysteine hydrolase; 5, serine hydroxymethyl transferase; 6, methylene tetrahydrofolate reductase.

such as meristematic cells found in root tips (Jabrin *et al.*, 2003), as compared with those present in quiescent tissues. It is likely that high C1 metabolism activities (methylation reactions, DNA synthesis) are required to sustain the major cellular events taking place during cell division. From this point of view, inhibition of folate synthesis by sulphonamides resulted in the arrest of germination (Gambonnet *et al.*, 2001). In addition to actively dividing tissues, folate synthesis and accumulation were high in photosynthetic leaves (Cossins, 2000; Scott *et al.*, 2000). Indeed, it is well known that the leafy parts of vegetables are among the best sources of folate (the term folate originates from the Latin name *folium*). We have previously shown that the folate concentration increased in the developing leaf, and the mature leaf eventually contains two to three times more folate than other plant tissues (Jabrin *et al.*, 2003). The physiological meaning of such an accumulation is unclear. Interestingly, we observed that mRNAs coding for the bifunctional dihydropterin pyrophosphokinase/dihydropteroate synthase (HPPK/DHPS), the mitochondrial enzyme catalysing the condensation of dihydropterin and p-aminobenzoate moieties (Mouillon *et al.*, 2002), have a similar pattern of expression during leaf development as mRNAs coding proteins involved in photosynthesis (Rubisco small subunit) and photorespiration (T, P and H proteins of the glycine decarboxylase system) (Vauclare *et al.*, 1996; Jabrin *et al.*, 2003). All these transcripts present a transient peak of expression with a maximum at day 6, which is the moment when the leaflet opens to become an efficient solar captor. This observation strongly suggests that folate is required for

the build-up, and perhaps turnover, of the photosynthetic apparatus. In support of this hypothesis, it was reported that etiolated leaves generally have less folate than green leaves and that illumination enhanced HPPK/DHPS mRNA expression (Jabrin *et al.*, 2003).

There are several possible connections between photosynthesis and C1 metabolism. First, folate is directly involved in photorespiration. A key step of this pathway takes place in leaf mitochondria, where two glycine molecules are converted into one serine molecule by the combined action of glycine decarboxylase (GDC) and serine hydroxymethyltransferase (SHMT) (Douce *et al.*, 2001). THF is an essential coenzyme for both activities (Rebeille *et al.*, 1994), and it is logical to think that folate accumulation in leaves, and more precisely within mitochondria, is required to maintain high photorespiratory activities. Although this hypothesis cannot be totally ruled out, analysis of cellular folate distribution in leaves suggested that folate accumulated more in the cytosol than in mitochondria during greening (Gambonnet *et al.*, 2001; Jabrin *et al.*, 2003). Alternatively, methylation reactions might be important during the biogenesis of the photosynthetic apparatus. Indeed, the synthesis of chlorophyll requires one methylation step to transform Mg-protoporphyrin IX into Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester, a reaction catalysed by the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase (CHLM) (Block *et al.*, 2002; Alawady *et al.*, 2005). Taking into account the high number of chlorophyll molecules that have to be synthesized in leaves, it is clear that there must be a huge demand for methyl units in this tissue. These methyl units

come from AdoMet, the universal methyl donor, which is synthesized and recycled in the cytosol from methyl-THF ( $\text{CH}_3\text{-THF}$ ) through a pathway called the methyl cycle (Fig. 1c). Impairing the transport of AdoMet towards chloroplasts affects plastid biogenesis (Bouvier *et al.*, 2006).

We have recently observed that inhibition of THF synthesis in cell suspension cultures may affect the concentration of several intermediates of the methyl cycle (Loizeau *et al.*, 2007). In the present article, we attempted to modulate the intracellular folate concentration in etiolated pea leaves with the aim of highlighting the role of folate cofactors in chlorophyll synthesis during de-etiolation.

## Materials and Methods

### Plant material

Pea (*Pisum sativum* L var. Douce Provence) seeds were imbibed during 18 h in circulating tap water and planted in moist vermiculite in 10-cm-diameter pots. Plants were grown for 12 d under a 12 h photoperiod ( $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at  $22^\circ\text{C}$  (day) and  $20^\circ\text{C}$  (night). Etiolated pea plants were grown in complete darkness at  $20^\circ\text{C}$  and etiolated leaves were collected under a green light. For MTX treatment, etiolated 8-d-old plants were watered with 20 ml of a water solution containing  $100 \mu\text{M}$  MTX and leaves were soaked for 5–10 s in the same solution. The operation was renewed the following day. De-etiolation experiments started at day 10: 10-d-old etiolated seedlings, treated or not with MTX, were transferred to continuous white light ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and leaves were harvested several times during a 24 h period. Leaf samples were immediately ground in liquid  $\text{N}_2$  with mortar and pestle and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. Three completely separate experiments, from seed imbibition to MTX treatment, were analysed in this study.

*Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*; ecotype Columbia) cell suspension cultures were grown under continuous light ( $40 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at  $22^\circ\text{C}$  with rotary agitation at 125 rpm in Gamborg's B5 medium supplemented with  $1 \mu\text{M}$  2-naphthalene acetic acid and 1.5% (w/v) sucrose. Cells were subcultured every 7 d.

### Measurements of metabolites

Determination of folates was done by LC-MS/MS (Zhang *et al.*, 2005). Following extraction, folylpolyglutamates were deconjugated in the presence of rat serum to generate the corresponding monoglutamate derivatives. Reversed-phase (RP) HPLC was performed using a Purospher Star RP-18 column ( $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$  particle size, Merck) and elution of folates was done using a gradient of 0.1% (v/v) formic acid ( $1 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $35^\circ\text{C}$ ). Folate detection was performed by an Applied Biosystems API4000 tandem quadrupole mass spectrometer.

Extraction of soluble amino acids was performed as previously described (Kreft *et al.*, 2003). Amino acids were

derivatized using O-phthaldialdehyde and analysed by RP-HPLC using an octadecyldimethylsilica column (Hypersil C18,  $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $3 \mu\text{m}$ , Knauer GmbH, Berlin, Germany) connected to an HPLC system (Agilent Technologies 1100 series, Santa Clara, CA, USA). Amino acids were eluted with a linear gradient of methanol in 50 mM sodium acetate, pH 5.7, at  $0.8 \text{ ml min}^{-1}$  and  $37^\circ\text{C}$ , and detected by fluorescence (excitation 340 nm, emission 455 nm).

Homocysteine (Hcy) was extracted and derivatized with monobromobimane using the procedure previously described (Kreft *et al.*, 2003). Derivatized thiols were subjected to RP-HPLC using an Atlantis dC18 column ( $250 \times 4.6 \text{ mm}$ ;  $5 \mu\text{m}$ ; Waters) connected to an HPLC system (Agilent Technologies 1100 series). Elution was done using an acetonitrile gradient in 57 mM sodium perchlorate, 0.25% (v/v) acetic acid, pH 3.4, at  $1 \text{ ml min}^{-1}$  and  $25^\circ\text{C}$ . Derivatized thiols were detected by fluorescence (excitation 388 nm, emission 480 nm).

The procedure used for AdoMet and S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) measurements was adapted from Castro *et al.* (2002). Metabolites were derivatized with chloroacetaldehyde and separated by RP-HPLC using a Nucleodur C18 Pyramid column ( $250 \times 4 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ; Macherey-Nagel, Hoerd, France) connected to an HPLC system (Agilent Technologies 1100 series). Elution was performed at  $1 \text{ ml min}^{-1}$  and  $25^\circ\text{C}$  with a linear gradient of acetonitrile in 50 mM sodium phosphate, pH 4.5. 1,N6-etheno derivatives of AdoMet and AdoHcy were detected by fluorescence (excitation 270 nm, emission 410 nm).

For chlorophyll determination, 100 mg of leaf tissue was disrupted in presence of 80% (v/v) acetone. The amount of chlorophyll in the acetone extracts were determined as previously described (Arnon, 1949).

### Magnesium protoporphyrin IX methyl transferase activity

Magnesium protoporphyrin IX methyl transferase activity was estimated from plastid envelope membranes purified from spinach leaves. Preparation of the envelope was made as previously described (Block *et al.*, 2002). CHLM activity was estimated by measuring the AdoMet-dependent accumulation of Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester (Bollivar *et al.*, 1994). Envelope membranes (*c.*  $40 \mu\text{g}$  proteins) were incubated at  $30^\circ\text{C}$  in 60  $\mu\text{l}$  of a reaction medium (50 mM MOPS, pH 7.7; 300 mM glycerol; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ) containing either 10, 500 or 1000  $\mu\text{M}$  AdoMet, 40  $\mu\text{M}$  Mg-protoporphyrin IX and various concentrations of AdoHcy. After 30 min, the reaction was blocked by addition of 400  $\mu\text{l}$  of stop medium (acetone/water/ammonia, 80/19/1, v/v) (Shepherd *et al.*, 2003). After centrifugation, a quantity of 50  $\mu\text{l}$  was injected in an HPLC system (Agilent Technologies 1100 series). HPLC conditions were as follows: LiChrospher 100 RP-18 column ( $150 \times 4 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ , Merck, Darmstadt, Germany); flow rate  $1 \text{ ml min}^{-1}$ ; Solvent A (methanol/5 mM tetrabutylammonium phosphate, 70/30, v/v) for 3 min then solvent B (methanol/water, 70/30, v/v) for 20 min. Peaks were detected by fluorescence

(excitation 420 nm, emission 595 nm). In our conditions, Mg-protoporphyrin IX was eluted in 5.5 min and Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester in 7.5 min. Within these standard conditions, the reaction was linear for 1 h.

### Protein electrophoresis and western blot analysis

Membrane-bound proteins from 100 mg of either frozen pea leaves or Arabidopsis cells were extracted using a phenol extraction procedure (Hurkman & Tanaka, 1986). Protein concentrations were determined (Lowry *et al.*, 1951), then proteins (10–20 µg) were separated by SDS/PAGE and electroblotted to nitrocellulose membrane. Membranes were probed with rabbit polyclonal antibodies raised against recombinant Arabidopsis CHLM (Block *et al.*, 2002) and diluted 1/1000. Detection was performed by chemiluminescence using secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase.

### CHLM mRNA expression

The relative abundance of the pea mRNA encoding CHLM was estimated by real-time quantitative PCR. First, total RNAs were extracted from pea leaves using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Then, a pea cDNA library was constructed from total RNA (1 µg) using the ThermoScript RT-PCR system (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in the presence of oligo(dT)<sub>18</sub>. To identify the gene sequence coding for pea CHLM, degenerate primers corresponding to consensus sequences found in all known plant CHLMs were first designed for PCR amplification. The following sequences were used: forward, 5' TGGMGSAAGATCTACGG; reverse, 5' GGBCCWGGGAAMARCTCTCC. A PCR product corresponding to the expected size of *c.* 500 bp was obtained. Sequencing of the amplicon resulted in sequence encoding a peptide of 160 residues showing 80% identity with tobacco and Arabidopsis CHLM (GenBank accession number FM210680). From this, sequence-specific primers (forward, 5' AGAGTTCAGCGGGATATTAGG; reverse, 5' CTTTAG-CCTGTTTCTCAGCTTC) were designed for real-time PCR. PCR was run using SYBR Green I reagent (SYBR Green JumpStart Taq ready Mix; Sigma, Lyon, France) and the Rotor-Gene 3000 system (Corbett Research, Sydney, Australia). Relative quantification was obtained using pea actin-2 reporter gene (GenBank accession number: X68649; specific primers: forward 5' AGTCATACCGTGCCAATCTATG; reverse 5' AGCAACGTAGGCAAGCTTCTC).

## Results

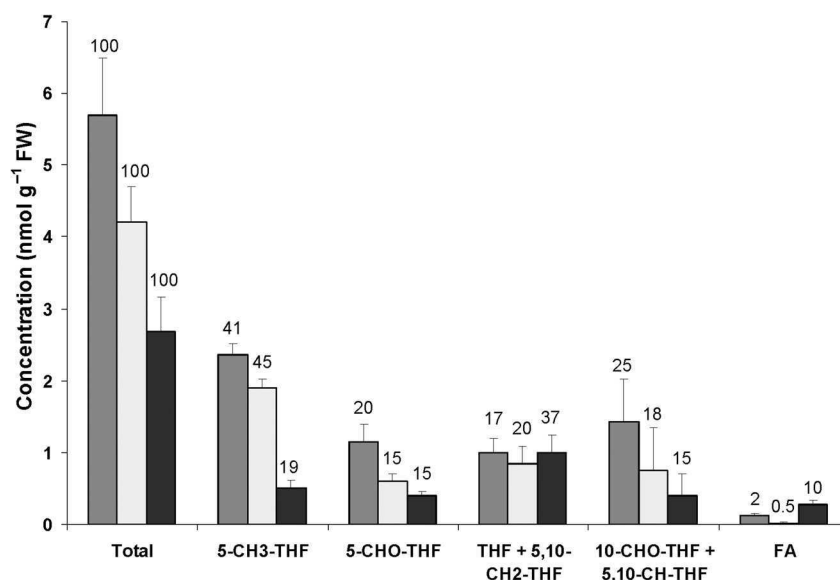
### Folate distribution in etiolated leaves – effect of methotrexate

Green pea leaves contain relatively high amounts of folate (approx. 5–7 nmol g<sup>-1</sup> FW, i.e. *c.* 250 pmol mg<sup>-1</sup> soluble

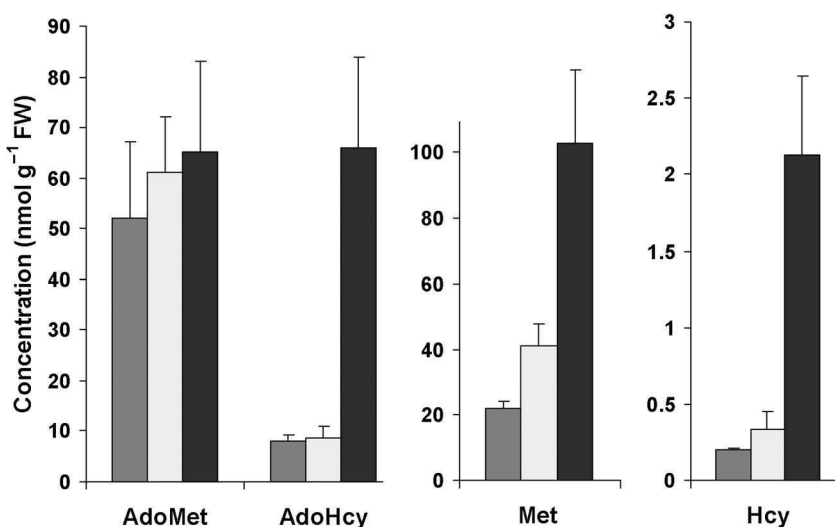
protein) (Chan & Cossins, 2003; Orsomando *et al.*, 2005), and etiolated pea leaves contain generally less (*c.* 2.5–4.5 nmol g<sup>-1</sup> FW) (Gambonnet *et al.*, 2001; Jabrin *et al.*, 2003). Despite these differences, distribution of the various derivatives was relatively similar in both tissues (Fig. 2), CH<sub>3</sub>-THF representing 35–45% of the total pool. Methotrexate is a specific inhibitor of dihydrofolate reductase (DHFR) (Fig. 1b). MTX-treated etiolated leaves had a folate concentration lowered by 30–40% (the concentration dropped from *c.* 4.2 to 2.7 nmol g<sup>-1</sup> FW). Despite the moderate effect on total folate concentration, analysis of the various folate species revealed important changes (Fig. 2). Indeed, the CH<sub>3</sub>-THF concentration was the most severely affected, decreasing by a factor of 4 (the concentration dropped from 2 to 0.5 nmol g<sup>-1</sup> FW), whereas the pool 'THF + CH<sub>2</sub>-THF' (the two derivatives cannot be distinguished by the analytical method; see De Brouwer *et al.*, 2007) remained almost unchanged. We also observed a 20-fold increase of folic acid that represented *c.* 10% of total folate in MTX-treated etiolated leaves. Folic acid is not a physiologically active folate derivative. It is generally found in trace amounts (less than 2% of the total folate), presumably formed by oxidative damage of the various derivatives during the extraction and analytical process. The presence of such a pool of folic acid in MTX-treated cells is possibly the result of the accumulation of a folate derivative highly susceptible to oxidation. Theoretically, inhibition of DHFR should result in DHF accumulation. This is not observed in these experiments, but DHF is a highly unstable compound that can be easily oxidized into folic acid or degraded during the heating steps required for the extraction procedure (De Brouwer *et al.*, 2007). Indeed, the presence of DHF is rarely reported and degradation under the experimental conditions can be one of the reasons. It is therefore possible that the accumulation of folic acid observed in MTX-treated cells reflected, at least in part, an increase of the cellular DHF concentration.

### The methyl cycle in etiolated leaves – effect of methotrexate

Methyl-tetrahydrofolate derivative is the folate species most affected by our MTX treatment. This cofactor is essential for Met synthesis, and because 80% of the pool of Met is involved in AdoMet synthesis and turnover (Giovannelli, 1987), the question arose as to whether such a situation had an impact on the methyl cycle activity. As shown in Fig. 3a, the AdoMet concentration was quite similar in green and etiolated leaves, and was not significantly changed by the MTX treatment. However, the AdoMet/AdoHcy ratio, often referred to as the methylation index, was strongly modified in MTX-treated etiolated leaves. Indeed, AdoHcy concentration increased by a factor of 6–7 in these leaves, shifting the AdoMet/AdoHcy ratio from 7 to *c.* 1. Methionine and Hcy are the two other main intermediates of the methyl cycle. The Met concentration was *c.* twofold higher in etiolated than in green leaves (Fig. 3b)



**Fig. 2** Concentration and distribution of the various folate derivatives in green and etiolated pea (*Pisum sativum*) leaf tissues. Green and etiolated leaves (10-d-old plants) were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and later analysed for their folate content as described in the Materials and Methods section. The distribution (expressed for each condition as a percentage of total, values above the bars) was similar in both green and etiolated tissues but changed with the methotrexate (MTX) treatment. Etiolated pea plants were treated with a 100  $\mu$ M MTX water solution on days 8 and 9, and then collected on day 10 (see the Materials and Methods section). Green, dark grey bars; etiolated, light grey bars; etiolated + MTX, black bars. Our analytic method cannot separate methylene-THF (5,10-CH<sub>2</sub>-THF) from THF. Because methenyl-THF (5,10-CH = THF) and formyl-THF (10-CHO-THF) are readily interchangeable through the methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase activity (Kirk *et al.*, 1995), we pooled the values corresponding to these two derivatives. FA, folic acid. Each value is the average of six determinations from three independent experiments  $\pm$  SD.



**Fig. 3** Effect of methotrexate (MTX) on the methyl cycle in etiolated pea (*Pisum sativum*) leaves. *S*-adenosylmethionine (AdoMet) and *S*-adenosylhomocysteine (AdoHcy) (a), methionine (Met) (b) and homocysteine (Hcy) (c) concentrations were determined in green (dark grey bars), etiolated (light grey bars) and MTX-treated etiolated (black bars) pea leaves. Etiolated pea plants were treated as described in the Materials and Methods section and collected on day 10. Each value is the average of three to six analyses from three independent replicates  $\pm$  SD.

and, surprisingly, it increased further following MTX treatment. The Hcy concentration was also strongly shifted upwards (Fig. 3c), increasing by a factor of 4–6. The concentration of a metabolite depends on equilibrium between the rates of production and utilization. The higher concentration of Hcy strongly suggests that its conversion into Met was hampered, as expected in case of CH<sub>3</sub>-THF shortage. However, the fact that the Met concentration remained high is also indicative of either a lower Met utilization (through the methyl cycle and/

or protein synthesis) or a higher *de novo* synthesis. Indeed, *de novo* synthesis of Met is located in plastids (Ravanel *et al.*, 2004a) and is not, therefore, directly connected with the methyl cycle in the cytosol. From this point of view, it is possible that a 'rescue' system took place in such a situation, in order to maintain Met and AdoMet concentrations. Such a system was observed in *Arabidopsis* cells where, in the case of strong folate deficiency, AdoMet and Met concentrations were rapidly restored after a temporary drop (Loizeau *et al.*, 2007). This

**Table 1** Effect of illumination on CH<sub>3</sub>-THF concentration and the methyl index in etiolated leaves of pea (*Pisum sativum*)

	Etiolated leaves				Etiolated leaves + MTX		
	Green leaves	Time of illumination			Time of illumination		
		0 h	12 h	24 h	0 h	12 h	24 h
Total folate	5.7 ± 0.8	4.2 ± 0.4	4.8 ± 0.6	5 ± 0.7	2.7 ± 0.5	3.2 ± 0.7	2.9 ± 0.5
5-CH <sub>3</sub> -THF	2.4 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Met	22 ± 2.5	41 ± 7	29 ± 3	21 ± 6	103 ± 22	70 ± 13	90 ± 22
AdoMet	52 ± 15	61 ± 10	55 ± 6	46 ± 11	65 ± 18	76 ± 20	55 ± 13
AdoMet/AdoHcy	6.6 ± 1.5	7.2 ± 0.9	7.7 ± 0.3	6.3 ± 1.5	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.2

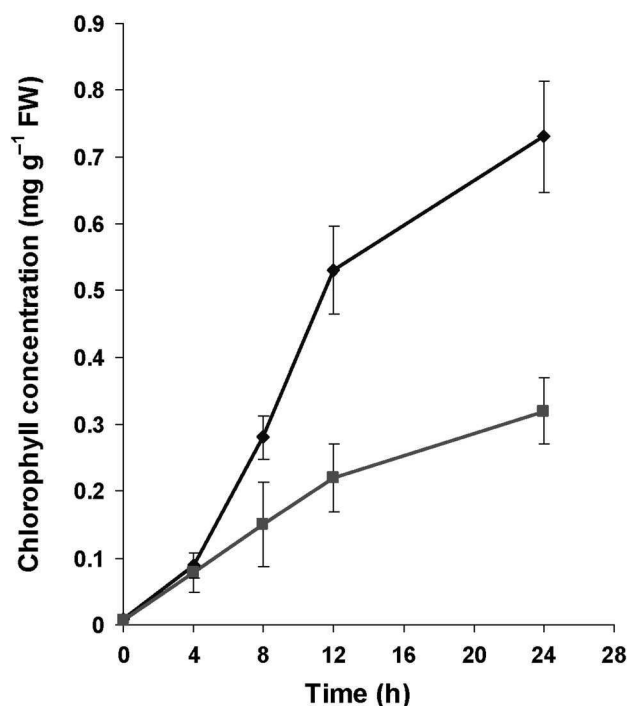
Etiolated pea seedlings were treated with a 100 µM methotrexate (MTX) water solution on days 8 and 9 (see the Materials and Methods section). Control and MTX-treated plants were illuminated at 10 d and collected at the indicated time. Results are expressed as nmol g<sup>-1</sup> FW. Each value is the average of three to six determinations from three independent replicates ± SD. AdoMet, S-adenosylmethionine; AdoHcy, S-adenosylhomocysteine; CH<sub>3</sub>-THF, methyl-tetrahydrofolate.

metabolic control possibly involves complex regulatory mechanism of *de novo* Met synthesis in plastids, where cystathionine-γ-synthase plays a key role (Hacham *et al.*, 2002; Loizeau *et al.*, 2007). Other amino acids linked to C1 metabolism, such as S-methylmethionine (*c.* 40–80 nmol g<sup>-1</sup> FW), which is possibly involved in phloem sulphur transport and regulation of AdoMet concentration (Bourgis *et al.*, 1999; Kocsis *et al.*, 2003), and serine (*c.* 1600–2000 nmol g<sup>-1</sup> FW) were not significantly changed by our MTX treatment of etiolated leaves (results not shown). Taken as a whole, these results are indicative of important modifications within the methyl cycle activity, Hcy and AdoHcy concentrations being the most affected by the MTX treatment. Similar observations were previously reported for Arabidopsis cells having a folate concentration lowered by 25-fold (Loizeau *et al.*, 2007). Our present data indicate that these events also occur with a moderate decrease of the folate content, suggesting a tight coupling between methyl cycle and folate synthesis.

Illumination of etiolated leaves did not markedly change the concentration of key intermediates of the methyl cycle (Table 1). In control plants there was a slight increase of the total folate concentration during the first 24 h, and the overall situation tended to evolve slowly towards that found in green leaves. These variations were not obvious in MTX-treated plants which maintained a low concentration of CH<sub>3</sub>-THF, a high concentration of AdoHcy and, therefore, a low methylation index. The most important changes were seen on chlorophyll synthesis (Fig. 4). Indeed, the rate of chlorophyll synthesis, illustrated by the accumulation of chlorophyll, was significantly decreased in MTX-treated leaves, at least during the first 24 h of illumination.

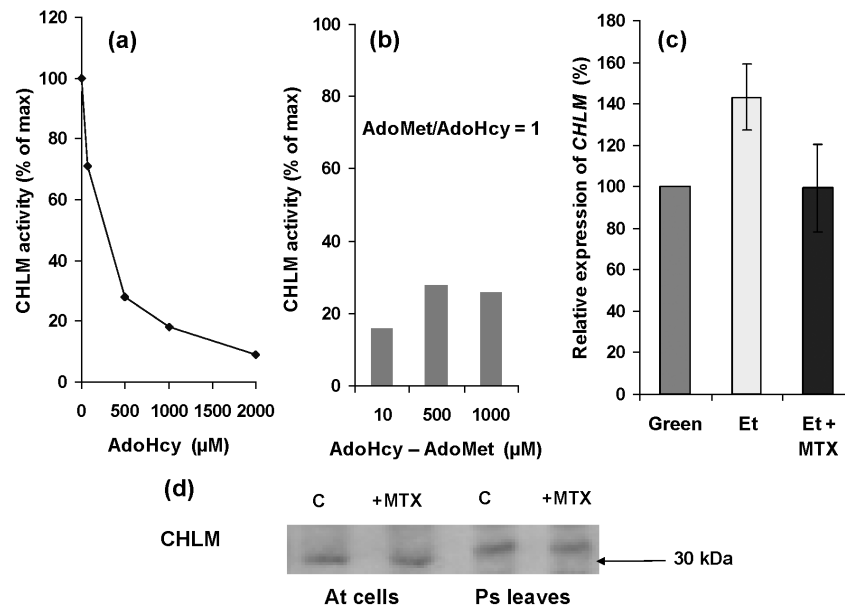
#### CHLM activity and expression

Mg-protoporphyrin IX methyltransferase (CHLM) activity is the logical link between methyl cycle and chlorophyll synthesis since it requires the substrate AdoMet. AdoMet is



**Fig. 4** Chlorophyll accumulation during greening of etiolated leaves. Etiolated pea (*Pisum sativum*) plants were treated as described in the Materials and Methods section. Control (diamonds) and methotrexate (MTX)-treated (squares) plants were illuminated on day 10 and collected at the indicated time. Each value is the average of three independent experiments ± SD.

synthesized in the cytosol and transported into chloroplasts by a carrier mediating the uniport uptake of AdoMet as well as an exchange between cytosolic and chloroplastic AdoMet and AdoHcy (Ravanel *et al.*, 2004a). Mutation in the gene coding this carrier led to a decrease in chlorophyll content (Bouvier *et al.*, 2006), illustrating the requirement of AdoMet for chlorophyll synthesis. In order to know if CHLM activity is regulated by AdoHcy, we evaluated the effect of various AdoHcy



**Fig. 5** Mg-protoporphyrin IX methyltransferase (CHLM) expression and activity. (a) Effect of *S*-adenosylhomocysteine (AdoHcy) concentration on the CHLM activity associated with purified envelope membrane. About 40 µg of envelope proteins were incubated for 30 min in the presence of 500 µM *S*-adenosylmethionine (AdoMet), 40 µM Mg-protoporphyrin IX and various concentrations of AdoHcy. Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester, the product of the reaction, was separated from Mg-protoporphyrin IX by HPLC. In separate control experiments, we verified that the reaction was linear for at least 1 h and strictly dependent on the presence of envelope, AdoMet and Mg-protoporphyrin IX. (b) Inhibition of CHLM maximal activity measured in the presence of various identical AdoMet and AdoHcy concentrations. (c) Relative expression of *CHLM* transcripts in 10-d-old pea leaves. Plants were treated or not with methotrexate (MTX) as described in the Materials and Methods section and collected on day 10. The values are expressed on the basis of the level of expression found in green leaves. Each value is the average of six determinations from two separate biological repeats ± SD. Et, etiolated tissues. (d) Western blot analyses of CHLM protein in Arabidopsis cells and etiolated pea leaves. The effect of MTX on Arabidopsis cells was estimated after 24 h of culture in the presence of 100 µM MTX, a condition that decreased the methylation index 40-fold. Proteins (20 µg per lane) from both control (C) and MTX-treated (+MTX) cells and leaves were separated by SDS/PAGE and electroblotted to nitrocellulose membrane. The membrane was probed with a rabbit antibody raised against recombinant Arabidopsis CHLM (Block *et al.*, 2002) and diluted 1/1000. Detection was performed by chemiluminescence using secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase.

concentrations on partially purified CHLM. As shown in Fig. 5a, CHLM activity decreased quickly with increasing AdoHcy concentration. Indeed, in the presence of 500 µM AdoMet, the activity decreased by a factor of 2.5–3 when the AdoMet/AdoHcy ratio was shifted from 7 to 1, the situation found in our experiments. Adjusting the AdoMet/AdoHcy ratio to 1 with various initial AdoMet and AdoHcy concentrations resulted in similar inhibition of the maximal activity (Fig. 5b). This suggests that the methyl index (rather than the absolute AdoHcy concentration) controlled CHLM activity, in agreement with the observation that AdoHcy exhibits competitive inhibition with respect to AdoMet for *Synechocystis* CHLM (Shepherd *et al.*, 2003).

In order to know if there was additional control at the genomic level, we measured *CHLM* mRNA relative expression. Mature CHLM is a 29.5 kDa protein in Arabidopsis, encoded by a single gene and targeted to the envelope and thylakoid membranes (Block *et al.*, 2002). To identify the gene sequence in pea, we screened a pea cDNA library (see the Materials and Methods section) and amplified by PCR a cDNA fragment of 500 bp encoding a peptide showing 80% identity with tobacco and Arabidopsis CHLM (see Supporting Information,

Fig. S1). By reference to actin-2 as internal standard, we observed that pea *CHLM* mRNA was present in etiolated leaves (Fig. 5c), as previously observed in tobacco (Alawady *et al.*, 2005), and its expression was not significantly changed by MTX treatment. In order to correlate mRNA expression with protein concentration, we estimated the amount of CHLM by western blotting, using a specific antibody raised against the Arabidopsis CHLM (Pontier *et al.*, 2007). The antibody cross-reacted with a protein of *c.* 32 kDa in pea and 30 kDa in Arabidopsis (Fig. 5d), but treatment with MTX had no obvious effect on the concentration of CHLM, either in pea leaves or in Arabidopsis cells. In these experiments, Arabidopsis cells were incubated for 24 h in the presence of 100 µM MTX, a situation that decreased the methylation index 40-fold (not shown).

## Discussion

The results presented here indicate that reducing dihydrofolate reductase activity in 10-d-old etiolated leaves triggers the following events: a partial decrease of the total folate content, CH<sub>3</sub>-THF being the derivative most affected; a marked

increase in the AdoHcy concentration associated with a drop of the methylation index; a lower rate of chlorophyll synthesis correlated with a decrease of CHLM activity.

In pea leaves, the CH<sub>3</sub>-THF pool represented *c.* 50% of total folate, a result in accordance with previous observations (Orsomando *et al.*, 2005). Earlier estimation of folate distribution within the different cellular compartments indicated that mitochondria accounted for 40%, plastids 10%, vacuoles 20% and cytosol 30% of total folate (Jabrin *et al.*, 2003; Orsomando *et al.*, 2005). Assuming that CH<sub>3</sub>-THF in the cytosol contributes 50% of cytosolic total folate, it can be estimated from Fig. 2 that CH<sub>3</sub>-THF in this compartment represents *c.* 0.6 nmol g<sup>-1</sup> FW. Considering the small volume of the cytosol, presumably 1/10–1/20 of the cell volume, it is likely that the cytosolic CH<sub>3</sub>-THF concentration ranged between 6 and 12 μM. This value is lower than the *K<sub>m</sub>* value (60 μM) recorded for the cytosolic Met synthase (Ravanel *et al.*, 2004a), suggesting that any decrease of CH<sub>3</sub>-THF within the cytosol should reduce Met synthesis and, consequently, perturb the cycle of methylations.

The marked increase of Hcy and AdoHcy observed in the presence of MTX was the most evident sign of a change in the methyl cycle activity. The increase of Hcy presumably resulted from the lower Met synthase activity, as is observed in animals in the case of insufficient dietary folate intake (Scott *et al.*, 2000). Because the reaction catalysed by AdoHcy hydrolase is reversible (Moffatt & Weretilnyk, 2001), part of the accumulating Hcy was converted back to AdoHcy, thus contributing to increase the AdoHcy concentration. AdoHcy is a potent inhibitor of most AdoMet-dependent methyltransferase and it is likely that, in turn, AdoMet utilization would decrease. Surprisingly, we did not observe significant change in AdoMet concentration. Similar results were also obtained with tobacco cells cultivated in the presence of a selective inhibitor of AdoHcy hydrolase (Fojtova *et al.*, 1998). In these experiments, AdoHcy concentrations dramatically increased (> 1000-fold) but the concentration of AdoMet remained almost unchanged. It is likely that AdoMet concentration is maintained constant through feedback regulation, since the products of the reaction, including AdoMet, were shown to inhibit AdoMet synthetase (Schroder *et al.*, 1997). This regulation would prevent AdoMet accumulation, thus contributing to maintain Met available for other vital processes such as protein synthesis.

As shown here, the decrease in the AdoMet/AdoHcy ratio affects the synthesis of Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester, decreasing the CHLM activity by a factor 3. This explains why chlorophyll synthesis was lowered during de-etiolation of pea leaves treated with MTX. These results point to a direct relationship between the methyl cycle and chlorophyll synthesis, through the AdoHcy-dependent metabolic control of CHLM. In addition, impairing CHLM activity might also contribute to decrease the light harvesting complex B (LHCB) synthesis since the *chl<sub>m</sub>* knockout mutant of Arabidopsis showed a severe reduction of *lhcb* gene expression (Pontier *et al.*, 2007).

These results emphasize the importance of the folate status in plant cells. Indeed, the folate concentration decreased by only 30–40%, and remained in the leaf tissue at a value similar to or even higher than that normally found in other tissues, such as roots and stems (Jabrin *et al.*, 2003). However, the metabolic and physiological consequences were important since the build-up of the photosynthetic apparatus following illumination of leaves was delayed, at least temporarily.

These findings also suggest that mild variations of the folate status in plants could have repercussions far beyond the reactions that directly involve the cofactor. As shown here, changes in CH<sub>3</sub>-THF concentration directly affect the methyl cycle equilibrium. Because this cycle is related to many branches of metabolism, multiple metabolic and physiological alterations could arise from such changes. From this point of view, it was observed in tobacco cells that increasing the AdoHcy concentration up to that of AdoMet resulted in a significant reduction in DNA methylation (Fojtova *et al.*, 1998), a situation that may, in turn, affect chromatin conformation and gene transcription. Thus, even moderate changes in the folate status might alter plant development and adaptation.

## Acknowledgements

We thank Dr Gilles Curien for helpful discussions. This work and salary of one author (VVW) were supported by a grant from the European Community: European Network on Vitamins and Cofactors Synthesis, no. HPRN-CT-2002-00244. The folate analysis was supported by grant GOA 1251204 (Bijzonder Onderzoeksfonds, UGent) to DVDS and WEL and by a bursary to VDB from the Institute for the Promotion of Innovation through Science and Technology in Flanders (IWT Vlaanderen).

## References

- Alawady A, Reski R, Yaronskaya E, Grimm B. 2005. Cloning and expression of the tobacco CHLM sequence encoding Mg protoporphyrin IX methyltransferase and its interaction with Mg chelatase. *Plant Molecular Biology* 57: 679–691.
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1–15.
- Basset GJC, Quinlivan EP, Gregory JF, Hanson AD. 2005. Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification. *Crop Science* 45: 449–453.
- Block MA, Tewari AK, Albriex C, Marechal E, Joyard J. 2002. The plant S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes. *European Journal of Biochemistry* 269: 240–248.
- Bollivar DW, Jiang ZY, Bauer CE, Beale SI. 1994. Heterologous expression of the *bchm* gene product from rhodobacter capsulatus and demonstration that it encodes S-adenosyl-L-methionine: Mg-protoporphyrin IX methyltransferase. *Journal of Bacteriology* 176: 5290–5296.
- Bourgis F, Roje S, Nuccio ML, Fisher DB, Tarczynski MC, Li C, Herschbach C, Rennenberg H, Pimenta MJ, Shen TL *et al.* 1999. S-methylmethionine plays a major role in phloem sulfur transport and is synthesized by a novel type of methyltransferase. *Plant Cell* 11: 1485–1498.

- Bouvier F, Linka N, Isner JC, Mutterer J, Weber AP, Camara B. 2006. Arabidopsis *samt1* defines a plastid transporter regulating plastid biogenesis and plant development. *Plant Cell* 18: 3088–3105.
- Castro R, Struys EA, Jansen EE, Blom HJ, de Almeida IT, Jakobs C. 2002. Quantification of plasma *s*-adenosylmethionine and *s*-adenosylhomocysteine as their fluorescent 1,N(6)-etheno derivatives: an adaptation of previously described methodology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 29: 963–968.
- Chan SY, Cossins EA. 2003. The intracellular distribution of folate derivatives in pea leaves. *Preridines* 14: 17–26.
- Cossins EA. 2000. The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Canadian Journal of Botany* 78: 691–708.
- De Brouwer V, Zhang GF, Storozhenko S, Van Der Straeten D, Lambert WE. 2007. pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochemical Analysis* 18: 496–508.
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rebeille F. 2001. The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* 6: 167–176.
- Fojtova M, Kovarik A, Votruba I, Holy A. 1998. Evaluation of the impact of *s*-adenosylhomocysteine metabolic pools on cytosine methylation of the tobacco genome. *European Journal of Biochemistry* 252: 347–352.
- Gambonnet B, Jabrin S, Ravel S, Karan M, Douce R, Rebeille F. 2001. Folate distribution during higher plant development. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 835–841.
- Giovanelli J. 1987. Sulfur amino acids of plants: an overview. *Methods in Enzymology* 143: 419–453.
- Hacham Y, Avraham T, Amir R. 2002. The N-terminal region of Arabidopsis cystathionine gamma-synthase plays an important regulatory role in methionine metabolism. *Plant Physiology* 128: 454–462.
- Hanson AD, Roje S. 2001. One-carbon metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 119–137.
- Hurkman WJ, Tanaka CK. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology* 81: 802–806.
- Jabrin S, Ravel S, Gambonnet B, Douce R, Rebeille F. 2003. One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiology* 131: 1431–1439.
- Kirk CD, Chen L, Imeson HC, Cossins EA. 1995. A 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase: 5,10-methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase protein from *Pisum sativum*. *Phytochemical* 39: 1309–1317.
- Kocsis MG, Ranocha P, Gage DA, Simon ES, Rhodes D, Peel GJ, Mellema S, Saito K, Awazuahara M, Li CJ *et al.* 2003. Insertional inactivation of the methionine *s*-methyltransferase gene eliminates the *s*-methylmethionine cycle and increases the methylation ratio. *Plant Physiology* 131: 1808–1815.
- Kreft O, Hoefgen R, Hesse H. 2003. Functional analysis of cystathionine gamma-synthase in genetically engineered potato plants. *Plant Physiology* 131: 1843–1854.
- Loizeau K, Gambonnet B, Zhang GF, Curien G, Jabrin S, Van Der Straeten D, Lambert WE, Rebeille F, Ravel S. 2007. Regulation of one-carbon metabolism in arabidopsis: the N-terminal regulatory domain of cystathionine gamma-synthase is cleaved in response to folate starvation. *Plant Physiology* 145: 491–503.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- Moffatt BA, Weretilnyk EA. 2001. Sustaining *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiology Plant* 113: 435–442.
- Mouillon JM, Ravel S, Douce R, Rebeille F. 2002. Folate synthesis in higher-plant mitochondria: coupling between the dihydropterin pyrophosphokinase and the dihydropterolate synthase activities. *The Biochemical Journal* 363: 313–319.
- Orsomando G, de la Garza RD, Green BJ, Peng M, Rea PA, Ryan TJ, Gregory JF 3rd, Hanson AD. 2005. Plant gamma-glutamyl hydrolases and folate polyglutamates: characterization, compartmentation, and co-occurrence in vacuoles. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 28 877–28 884.
- Pontier D, Albrieux C, Joyard J, Lagrange T, Block MA. 2007. Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in arabidopsis. Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 2297–2304.
- Ravel S, Block MA, Rippert P, Jabrin S, Curien G, Rebeille F, Douce R. 2004a. Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for de novo methionine synthesis and can import *S*-adenosylmethionine from the cytosol. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 22 548–22 557.
- Ravel S, Douce R, Rebeille F. 2004b. The uniqueness of tetrahydrofolate synthesis and one-carbon metabolism in plants. In: Day DA, Millar H, Whelan J, eds. *Plant mitochondria from genome to function*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 277–292.
- Rebeille F, Neuburger M, Douce R. 1994. Interaction between glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase and tetrahydrofolate polyglutamates in pea leaf mitochondria. *The Biochemical Journal* 302: 223–228.
- Rebeille F, Ravel S, Jabrin S, Douce R, Storozhenko S, Van Der Straeten D. 2006. Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement. *Physiology Plant* 126: 330–342.
- Rebeille F, Ravel S, Marquet A, Mendel RR, Smith AG, Warren MJ. 2007. Roles of vitamins b5, b8, b9, b12 and molybdenum cofactor at cellular and organismal levels. *Natural Product Reports* 24: 949–962.
- Schroder G, Eichel J, Breinig S, Schroder J. 1997. Three differentially expressed *s*-adenosylmethionine synthetases from *catharanthus roseus*: molecular and functional characterization. *Plant Molecular Biology* 33: 211–222.
- Scott J, Rebeille F, Fletcher J. 2000. Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 795.
- Shepherd M, Reid JD, Hunter CN. 2003. Purification and kinetic characterization of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase from *synechocystis pcc6803*. *Biochemical Journal* 371: 351–360.
- Storozhenko S, Ravel S, Zhang GF, Rebeille F, Lambert W, Van Der Straeten D. 2005. Folate enhancement in staple crops by metabolic engineering. *Trends in Food Science & Technology* 16: 271–281.
- Vauclare P, Diallo N, Bourguignon J, Macherel D, Douce R. 1996. Regulation of the expression of the glycine decarboxylase complex during pea leaf development. *Plant Physiology* 112: 1523–1530.
- Zhang GF, Mortier KA, Storozhenko S, Van De Steene J, Van Der Straeten D, Lambert WE. 2005. Free and total para-aminobenzoic acid analysis in plants with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19: 963–969.

## Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Fig. S1** Sequence alignment of the deduced amino acid sequence from the 500 bp PCR product corresponding to an internal part of the putative pea (Ps) *CHLM* (GenBank accession FM210680), with native *CHLMs* from Arabidopsis (At; AT4G25080) and Tobacco (Nt; GenBank accession AF213968)

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



		10	20	30	40	50	60																																																				
Nt ChlMT (native)		M	A	F	S	S	P	L	F	S	P	V	N	F	A	L	N	P	N	P	Q	I	H	K	C	K	P	N	R	R	N	F	S	V	C	A	I	P	P	L	S	T	A	T	D	I	S	A	V	T	G	P	L	D	G	T	T	L	A
At ChlMT (native)		M	F	F	A	P	S	L	L	S	S	S	S	S	V	S	Q	F	L	F	R	F	-	P	N	A	T	R	F	N	V	T	P	R	S	R	A	A	T	V	V	A	A	S	V	T	D	L	A	G	V	---	D	S	T	T	I	A	
Ps ChlMT (peptide)		-----																																																									

		70	80	90	100	110	120																																																			
Nt ChlMT (native)		V	L	G	G	S	V	A	A	A	I	L	S	L	A	D	F	E	R	R	R	Q	L	A	E	E	V	G	G	D	K	E	V	V	R	E	Y	F	N	N	G	F	Q	R	W	K	K	I	Y	G	D	T	D	D	V			
At ChlMT (native)		V	L	G	G	S	V	A	A	L	A	M	V	S	L	T	D	F	E	R	R	R	K	L	Q	A	E	E	V	G	G	D	K	E	V	V	R	E	Y	F	N	S	T	G	F	E	R	W	R	K	I	Y	G	E	T	D	E	V
Ps ChlMT (peptide)		-----	-----	-----	-----	-----	-K	I	Y	G	D	T	D	D	V																																											

		130	140	150	160	170	180																																																					
Nt ChlMT (native)		N	K	V	Q	L	D	I	R	L	G	H	S	K	T	V	E	N	V	M	K	M	L	T	E	G	S	L	Q	G	V	T	V	C	D	A	G	C	G	T	G	L	S	I	P	L	A	K	E	G	A	V	V	S	A	S	D	I	S	
At ChlMT (native)		N	R	V	Q	K	D	I	R	L	G	H	A	K	T	V	E	N	T	M	L	M	L	T	E	D	R	S	L	A	G	V	T	V	C	D	A	G	C	G	T	G	L	S	I	P	L	A	K	E	G	A	I	V	S	A	S	D	I	S
Ps ChlMT (peptide)		N	R	V	Q	R	D	I	R	L	G	H	S	K	T	V	E	N	A	L	Q	M	L	K	E	G	S	L	E	G	V	T	V	C	D	A	G	C	G	T	G	L	S	I	P	L	A	K	E	G	A	V	V	C	A	S	D	I	S	

		190	200	210	220	230	240																																																			
Nt ChlMT (native)		A	S	M	V	A	E	A	Q	K	A	Q	E	L	F	K	D	K	D	Q	S	F	A	P	V	M	P	K	F	E	V	K	D	L	E	S	L	D	G	K	Y	D	T	V	V	C	L	D	V	M	I	H	Y	P	Q	S	K	A
At ChlMT (native)		A	A	M	V	A	E	A	E	M	K	A	K	A	Q	L	-----	P	S	E	N	L	P	K	F	E	V	N	D	L	E	S	L	T	G	K	Y	D	T	V	V	C	L	D	V	L	I	H	Y	P	Q	N	K	A				
Ps ChlMT (peptide)		A	A	M	V	A	E	A	E	K	A	K	E	Q	L	-----	V	S	S	V	M	P	K	F	V	S	D	L	E	S	L	E	G	L	Y	D	T	V	V	C	L	D	V	M	I	H	Y	P	Q	S	K	A						

		250	260	270	280	290	300																																																				
Nt ChlMT (native)		D	G	M	I	A	H	L	A	S	L	A	E	N	R	L	L	S	F	A	P	K	T	F	Y	D	L	L	K	R	I	G	E	L	F	P	G	P	S	K	A	T	R	A	Y	L	H	E	A	D	V	E	R	A	L	Q	K	A	
At ChlMT (native)		D	G	M	I	A	H	L	A	S	L	A	E	K	R	V	L	S	F	A	P	K	T	F	Y	D	I	L	K	R	I	G	E	L	F	P	G	P	S	K	A	T	R	A	Y	L	H	S	E	A	D	V	E	R	A	L	G	K	V
Ps ChlMT (peptide)		D	G	M	I	A	H	L	A	S	L	A	E	K	R	L	V	S	F	A	P	K	T	F	Y	D	A	L	K	R	V	G	E	L	F	P	G	P	-----																				

		310	320																							
Nt ChlMT (native)		G	W	K	I	R	K	R	G	L	I	A	T	Q	F	Y	F	A	K	L	I	E	A	V	P	A
At ChlMT (native)		G	W	K	I	S	K	R	L	T	T	Q	F	Y	F	S	R	L	I	E	A	V	M			
Ps ChlMT (peptide)		-----																								

Supplementary figure

## CHAPITRE III

---

**Régulation de la synthèse de méthionine chez *Arabidopsis* :  
le domaine régulateur N-terminal de la cystathionine  $\gamma$ -  
synthase est clivé en réponse à une carence en folates.**

**Regulation of One-Carbon Metabolism in Arabidopsis: The N-Terminal  
Regulatory Domain of Cystathionine  $\gamma$ -Synthase Is Cleaved in Response to  
Folate Starvation**

**Plant Physiology. 2007 Oct;145(2):491-503**

Karen Loizeau, Bernadette Gambonnet, Guo-Fang Zhang, Gilles Curien, Samuel Jabrin,  
Dominique Van Der Straeten, Willy E. Lambert, Fabrice Rébeillé and Stéphane Ravanel.s

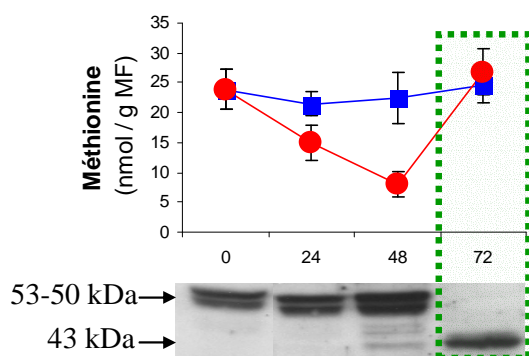


## Chapitre III

### Régulation de la synthèse de méthionine chez *Arabidopsis* : le domaine régulateur N-terminal de la cystathionine $\gamma$ -synthase est clivé en réponse à une carence en folates

Dans de nombreuses situations physiologiques, l'abondance du 5-CH<sub>3</sub>-THF ainsi que le niveau d'expression élevé des gènes / enzymes participant à la synthèse de méthionine et de SAM indiquent qu'une part importante des unités C1 portées par les folates est dirigée vers ces voies anaboliques. Aucune donnée de la littérature ne mentionne de processus de régulation qui permette de coordonner l'homéostasie en folates et la biosynthèse de méthionine et de SAM afin d'assurer les très nombreuses réactions de méthylation cellulaires. En instaurant de façon prolongée une situation de carence en folates dans des cellules d'*Arabidopsis*, nous avons pu mettre en évidence un processus original de régulation de la synthèse de méthionine.

Le traitement des cultures cellulaires à l'aide d'une combinaison d'antifolates (MTX et sulfanilamide, MTXS) conduit à une très forte diminution du pool de folates ainsi qu'à une perturbation de l'équilibre entre les différents dérivés. Ainsi, le pool de 5-CH<sub>3</sub>-THF est le plus fortement réduit, ce qui entraîne de profondes perturbations du cycle des méthyles. En particuliers, les dosages par HPLC montrent une diminution de 50 % et 70 % des teneurs intracellulaires en méthionine et en SAM, respectivement, après 48 h de traitement MTXS. De façon très surprenante, nous avons observé, entre 48h et 72 h de traitement au MTXS, une restauration des pools de méthionine et de SAM qui retrouvent alors des niveaux équivalents à ceux mesurés chez des cellules témoins (Figure 1). L'analyse par western-blot des niveaux d'expression des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de méthionine a permis de relier ce rétablissement des niveaux d'origine de méthionine et de SAM à une modification post-traductionnelle totalement originale de la cystathionine  $\gamma$ -synthase (CGS), première enzyme impliquée dans la synthèse *de novo* de méthionine. En effet, après 72 heures de traitement, on observe une modification de la masse moléculaire apparente de la CGS qui passe de 53 kDa à 43 kDa (Figure 1). Cette modification consiste en un clivage de 92 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la protéine. A ce jour, nous n'avons pas identifié la (ou les) protéase(s) responsable(s) de ce clivage bien que l'emploi de différents inhibiteurs indique qu'au moins une protéase à sérine est impliquée dans ce processus.



**Figure 1 : Restauration du pool de méthionine et clivage simultané de la CGS en situation de carence en folates.**

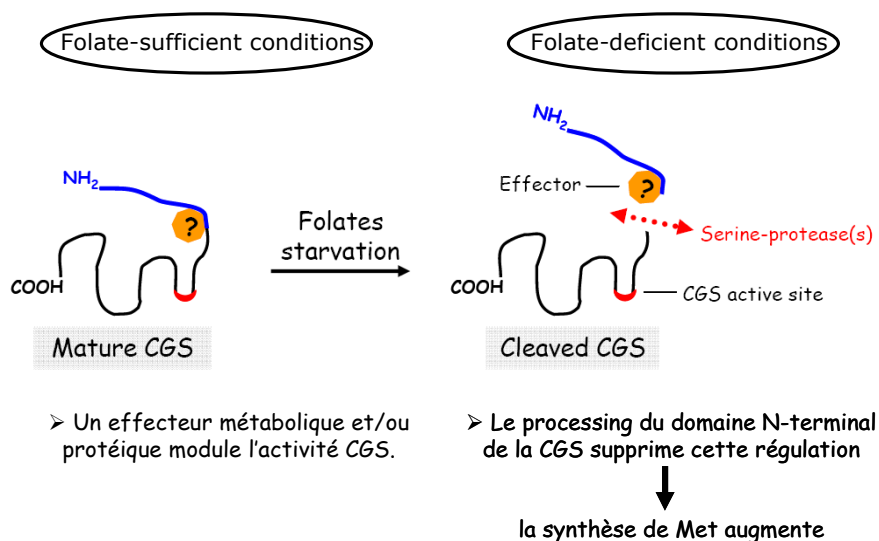
En haut : la méthionine libre a été dosée par HPLC à partir d'extraits de cellules témoins (■) ou de cellules traitées au MTXS (●). En bas : le profil d'expression de la CGS issue de cellules traitées au MTXS a été analysé par western-blot. A partir de 72 heures de traitement au MTXS, la CGS présente une modification de sa masse moléculaire apparente, qui passe de 53-50 kDa à 43 kDa, de façon concomitante avec la restauration du pool de méthionine.

Ce processus de clivage est spécifiquement associé à une carence en folates. En effet, une supplémentation de cellules traitées au MTXS par de la leucovorine (5-CHO-THF) permet de contrer le déficit en folates et de conserver la forme entière de la CGS. En revanche, les cellules traitées au MTXS et supplémentées par de la méthionine arborent la forme clivée de l'enzyme, ce qui écarte la possibilité que cette modification post-traductionnelle soit induite par une carence en méthionine ou en SAM. De même, des stress nutritionnels (sulfate), oxydatifs (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou salins ne conduisent pas à une modification de la CGS. Nous avons pu observer ce clivage de la CGS sur des feuilles d'*Arabidopsis* traitées au MTXS mais également chez d'autres espèces comme le pois et le maïs, ce qui tend à démontrer la conservation de ce mécanisme entre différentes espèces végétales.

Des mesures par HPLC de l'activité CGS du polypeptide de 43 kDa confirment bien qu'il s'agit d'une CGS active. L'alignement des séquences protéiques de CGS de différentes espèces confirme que l'élimination de l'extrémité N-terminale n'affecte pas le domaine catalytique de l'enzyme. Néanmoins, la comparaison des propriétés cinétiques *in vitro* des enzymes mature, c'est-à-dire dépourvue de sa séquence d'adressage au plaste, et clivée ne montre pas de différence d'efficacité catalytique entre les deux formes de la CGS.

Si ces analyses cinétiques, réalisées *in vitro*, démontrent que le clivage de l'extrémité N-terminale de la CGS ne confère pas à l'enzyme d'avantage catalytique, deux éléments tendent à démontrer que la situation *in vivo* est tout à fait différente. En effet, nous avons constaté que la restauration du pool de méthionine intervient de façon synchrone avec l'apparition de la forme clivée de la CGS (Figure 1). Egalement, Hacham et al (2002) ont constaté une accumulation de méthionine dans des plants de tabac transgéniques surexprimant une forme courte de CGS (très proche de la forme clivée) par rapport à des plants surexprimant la forme mature de l'enzyme. Le domaine N-terminal de la CGS agit donc *in vivo* comme un régulateur de l'activité de l'enzyme.

Sur la base de ces résultats, nous avons proposé un modèle de la régulation de la synthèse de méthionine en situation de carence en folates (Figure 2). Dans des conditions physiologiques, le domaine N-terminal de la CGS jouerait un rôle régulateur de l'activité enzymatique *via* l'interaction d'un effecteur métabolique et / ou protéique. Dans des conditions de carence en folates, l'élimination de ce domaine conduirait à une levée de ce contrôle et par la suite à une augmentation de la synthèse de méthionine.



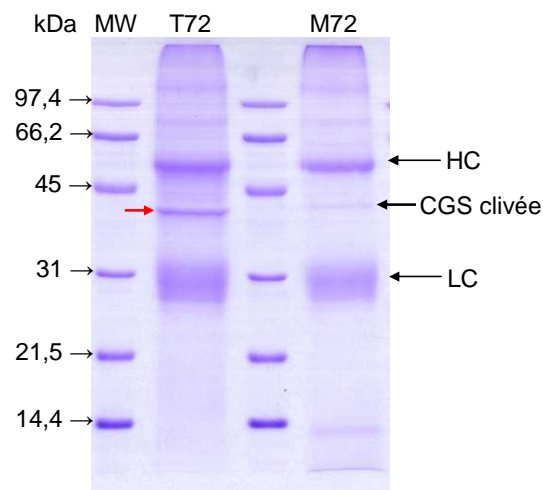
**Figure 2 :** Modèle illustrant le rôle régulateur du domaine N-terminal de la cystathionine  $\gamma$ -synthase.

Afin d'identifier un éventuel effecteur interagissant avec l'extrémité N-terminale de la CGS, nous avons testé l'effet de différents métabolites en relation avec le métabolisme C1 sur l'enzyme mature purifiée (méthionine, SAM, SAH, Hcy, sérine, glycine et 5-CH<sub>3</sub>-THF). Nous avons également testé l'effet d'un extrait acellulaire déprotéinisé issu de cellules traitées au MTXS pendant 72 h. Dans les deux cas, aucune différence de comportement cinétique n'a été observée entre la forme mature et la forme clivée de la CGS. Ces résultats n'excluent pas l'interaction directe d'un métabolite avec le domaine N-terminal de la CGS mais il est vraisemblable que la régulation de l'activité de la CGS s'exerce par le biais d'un effecteur protéique qui reste à identifier.

### **Essai d'identification d'un partenaire protéique interagissant avec le domaine N-terminal de la CGS**

Le modèle de régulation de l'activité de la CGS que nous proposons suggère l'intervention d'un partenaire protéique qui, en situation physiologique, se lierait à l'extrémité N-terminale de la CGS mature. Afin d'identifier un tel partenaire, nous avons immunoprécipité la CGS grâce à des anticorps spécifiquement dirigés contre l'enzyme d'*Arabidopsis*. Un contrôle sur gel d'acrylamide indique si l'enzyme a entraîné avec elle d'autres protéines qui sont alors considérées comme des partenaires potentiels. Selon notre hypothèse, le partenaire se lierait à la forme mature de la CGS mais ne pourrait pas interagir avec la forme clivée (Figure 2). L'immunoprécipitation a donc été réalisée en parallèle sur un extrait protéique issu de cellules d'*Arabidopsis* témoin (T72) et sur un extrait protéique présentant la forme clivée de la CGS (M72). Ainsi, une protéine se révèle être un partenaire potentiel si elle apparaît uniquement dans la piste T72. Egalement, la localisation subcellulaire du partenaire doit être en accord avec celle de la CGS, enzyme exclusivement localisée dans les plastes.

Une seule bande nette, de masse apparente  $40 \pm 2$  kDa, a été obtenue par immunoprécipitation de l'extrait T72 (Figure 3). Dans cette bande, susceptible de contenir le partenaire protéique de la CGS, 13 protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse (collaboration avec le Laboratoire d'Etude de la Dynamique des Protéomes, CEA Grenoble) (Tableau 1). Parmi ces protéines, 9 sont connues pour participer au métabolisme énergétique. En effet, les isoformes plastidiales de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ainsi que la fructose-bisphosphate aldolase sont impliquées dans la photosynthèse. Les sous-unités de l'isocitrate déshydrogénase jouent, quant à elles, un rôle dans le cycle de Krebs. De plus, la glucose-fructose oxydoréductase est une enzyme qui converti le glucose et le fructose en glucitol et en gluconolactone dans la voie du sorbitol-gluconate. La spectrométrie de masse a également permis d'identifier 2 facteurs impliqués dans l'initiation et l'élongation de la traduction dans le cytosol. De part leur fonction et / ou leur localisation subcellulaire, ces protéines ne semblent pas être des partenaires spécifiques de la CGS (certaines de ces protéines sont abondantes et souvent retrouvées comme contaminants dans des analyses de co-immunoprécipitation ou de protéomique). Il reste alors 2 candidats pouvant potentiellement interagir avec l'extrémité N-terminale de la CGS. Parmi ceux-ci, la protéine LEA (Late Embryogenesis Abundant protein) peut-être exclue en raison de sa localisation dans la membrane plasmique. Seule une protéine isolée par cette expérience d'immunoprécipitation peut prétendre être impliquée dans la modulation de l'activité de la CGS. Cependant, cette protéine est annotée comme une oxydoréductase, fonction prédite qui ne s'accorde pas *a priori* à notre modèle de régulation de la synthèse de méthionine en situation de carence en folates.



**Figure 3 : Immunoprécipitation de la CGS d'Arabidopsis présente dans des cellules témoins ou carencées en folates.**

Un extrait protéique total préparé à partir de cellules d'Arabidopsis témoins (T72) ou traitées au MTX (M72) est immunoprécipité en utilisant des anticorps anti-CGS couplés à la protéine A-agarose. Les protéines co-immunoprécipitées avec la CGS sont analysées sur gel d'acrylamide coloré au bleu de Coomassie. Sur chacune des 2 pistes on peut observer les chaînes lourdes (HC) et légères (LC) des IgG des anticorps anti-CGS. Alors que la forme clivée de la CGS est visible dans la piste M72, la CGS mature est masquée par les HC dans la piste T72. La bande pointée par une flèche rouge a été découpée puis analysée par spectrométrie de masse.

Description	Primary acc.	Score	Mass (Da)	#peptides
Putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (unclear)	Q9FX54	792,01	36890	11
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A subunit 1 (plast)	P25856	447,18	42463	7
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunit 2 (plast)	Q9LPW0	342,42	42820	6
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B (plast)	P25857	191,14	47630	3
Putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (plast)	Q9SAJ6	336,72	44803	5
Fructose-bisphosphate aldolase (unclear)	Q9LF98	355,75	38516	5
Isocitrate dehydrogenase catalytic subunit 5 (mitochondrion)	Q9LZG1	309,35	40367	5
Isocitrate dehydrogenase regulatory subunit 41 (mitochondrion)	Q8LFC0	187,78	39632	3
Glucose-fructose oxydoreductase (unclear)	Q8RWP0	165,51	38554	3
Eukaryotic initiation factor 4A-1 (cytosol)	P41376	300,77	46675	5
Elongation factor 1-alpha (cytosol)	Q94AD0	149,91	49420	3
Similar to late embryogenesis abundant proteins (plasma membrane)	Q8LCW6	329,21	35885	5
Oxydoreductase auxin-induced atb2 (unclear)	Q9SEX1	104,82	37976	3

**Tableau 1 : Protéines co-immunoprécipitées avec la CGS dans l'extrait T72 et identifiées par spectrométrie de masse.**

Seules les protéines identifiées sur la base d'au moins 3 peptides sont indiquées ici. Les numéros d'accès correspondent aux entrées des polypeptides dans la base de données UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). La localisation subcellulaire prédite ou avérée des protéines est indiquée entre parenthèses.

Au stade actuel de ce travail, aucun effecteur de la CGS, qu'il soit métabolique ou protéique, n'a pu être identifié. Cependant, l'étude décrite dans ce chapitre confirme que le domaine N-terminal constitue un élément clé de la régulation de la synthèse de méthionine. En effet, celui-ci intervient dans le contrôle post-transcriptionnel de la quantité de CGS *via* le domaine MTO (Onouchi et al, 2005). De plus, nous avons observé que son clivage en situation de carence en folates permet de stimuler la synthèse de méthionine. Les situations physiologiques au cours desquelles ce processus de régulation post-traductionnelle se met en place restent pour l'instant inconnues.

# Regulation of One-Carbon Metabolism in Arabidopsis: The N-Terminal Regulatory Domain of Cystathionine $\gamma$ -Synthase Is Cleaved in Response to Folate Starvation<sup>1[W]</sup>

Karen Loizeau, Bernadette Gambonnet, Guo-Fang Zhang, Gilles Curien, Samuel Jabrin, Dominique Van Der Straeten, Willy E. Lambert, Fabrice Rébeillé, and Stéphane Ravanel\*

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Unité Mixte de Recherche 5168 Centre National de la Recherche Scientifique-Commissariat à l'Énergie Atomique-Institut National de la Recherche Agronomique-Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Commissariat à l'Énergie Atomique-Grenoble, F-38054 Grenoble cedex 9, France (K.L., B.G., G.C., S.J., F.R., S.R.); and Laboratory of Toxicology (G.-F.Z., W.E.L.) and Unit Plant Hormone Signaling and Bio-imaging, Department of Molecular Genetics (D.V.D.S.), Ghent University, B-9000 Ghent, Belgium

In all organisms, control of folate homeostasis is of vital importance to sustain the demand for one-carbon (C1) units that are essential in major metabolic pathways. In this study we induced folate deficiency in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) cells by using two antifolate inhibitors. This treatment triggered a rapid and important decrease in the pool of folates with significant modification in the distribution of C1-substituted folate coenzymes, suggesting an adaptive response to favor a preferential shuttling of the flux of C1 units to the synthesis of nucleotides over the synthesis of methionine (Met). Metabolic profiling of folate-deficient cells indicated important perturbation of the activated methyl cycle because of the impairment of Met synthases that are deprived of their substrate 5-methyl-tetrahydrofolate. Intriguingly, S-adenosyl-Met and Met pools declined during the initial period of folate starvation but were further restored to typical levels. Reestablishment of Met and S-adenosyl-Met homeostasis was concomitant with a previously unknown posttranslational modification that consists in the removal of 92 amino acids at the N terminus of cystathionine  $\gamma$ -synthase (CGS), the first specific enzyme for Met synthesis. Rescue experiments and analysis of different stresses indicated that CGS processing is specifically associated with perturbation of the folates pool. Also, CGS processing involves chloroplastic serine-type proteases that are expressed in various plant species subjected to folate starvation. We suggest that a metabolic effector, to date unidentified, can modulate CGS activity in vivo through an interaction with the N-terminal domain of the enzyme and that removal of this domain can suppress this regulation.

Many aspects of plant metabolism and development require the addition or removal of one-carbon (C1) units (C1 metabolism) for biosynthetic or regulatory functions. The role of tetrahydrofolate (THF) derivatives, collectively termed folate(s), is to transport and donate C1 units, which exist under various oxidation states to enable several major anabolic processes (Hanson and Roje, 2001). For example, 10-formyl-THF is involved in purine and 10-formyl-Met-tRNA synthesis, 5,10-methylene-THF is required for thymidylate and pantothenate synthesis and for Gly to Ser conversion, and 5-methyl-THF is the methyl donor for the synthesis of Met. Analyses of the physiological role of folates indicated that a major fate of C1 units in

photosynthetic leaves from C3 plants is the conversion of Gly into Ser (Fig. 1), which is a crucial step in photorespiration (Ravanel et al., 2004b). Also, an important anabolic fate of C1 units is the synthesis of Met, which is in part incorporated into protein but mainly converted to S-adenosyl-Met (AdoMet; Fig. 1; Ravanel et al., 2004b). AdoMet is a universal methyl-group donor participating in dozens of methyltransferase reactions and it is involved in the biogenesis of biotin and polyamines. AdoMet also plays unique roles in plants, such as ethylene and nicotianamine syntheses, and regulation of the synthesis of Asp-derived amino acids (Curien et al., 1998, 2007).

An attractive challenge is to understand how folate homeostasis is controlled to match the supply of C1 units with demand, and how C1 units are accurately distributed between different anabolic routes. To address this problem, several authors used NMR techniques to measure C1-unit fluxes associated with Ser and Gly metabolism in plants. Thus, Prabhu et al. (1998) exposed Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) plants to folate antagonists and determined that a continuous supply of folates was essential to maintain high rates of Ser synthesis. Also, plant cell cultures treated with

<sup>1</sup> This work was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of Research (to K.L.).

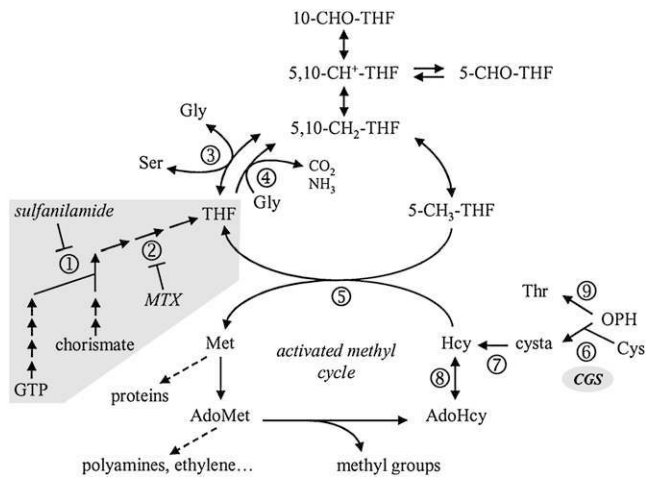
\* Corresponding author; e-mail sravanel@cea.fr.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors ([www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)) is: Stéphane Ravanel (sravanel@cea.fr).

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

[www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.105379](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.107.105379)





**Figure 1.** Synthetic overview of C1 metabolism in plant cells. The synthesis of THF is shown on a gray background. The enzymes that are specifically inhibited by sulfanilamide and MTX are dihydropterote synthase (1) and dihydrofolate reductase (2), respectively. The enzymes that utilize folate coenzymes are Ser hydroxymethyltransferase (3), Gly decarboxylase (4), and Met synthase (5). CGS (6) and cystathionine  $\beta$ -lyase (7) are involved in de novo synthesis of Met. AdoHcy hydrolase (8) catalyzes the reversible conversion of AdoHcy to Hcy and adenosine. Thr synthase (9) competes with CGS for the common substrate OPH to synthesize Thr. C1 units transported by THF are 10-formyl (10-CHO), 5-formyl (5-CHO), 5,10-methenyl (5,10-CH<sup>+</sup>), 5,10-methylene (5,10-CH<sub>2</sub>), and 5-methyl (5-CH<sub>3</sub>). cysa, Cystathionine.

the folate analog methotrexate (MTX) displayed an important inhibition of their growth (Wu et al., 1993), thus emphasizing the crucial role of folates in cell division and nucleotide synthesis. Apart from these data, the consequences of modification of folates pool size on the other pathways of C1 metabolism, particularly the synthesis of Met, are largely unknown.

The three enzymes involved in de novo synthesis of Met in plants are located in chloroplasts (Ravanel et al., 2004a). The first two enzymes, cystathionine  $\gamma$ -synthase (CGS) and cystathionine  $\beta$ -lyase, convert Cys into homo-Cys (Hcy), which is then methylated to Met by transfer of the methyl group of 5-methyl-THF, a reaction catalyzed by Met synthase (Fig. 1). The principal fate of Met is the synthesis of AdoMet in the cytosol, which is then largely used for methylation reactions in all cell compartments. Utilization of the methyl group of AdoMet by methyltransferases is accompanied by recycling of the homocysteinyl moiety and regeneration of Met, a set of reactions located in the cytosol and designated as the activated methyl cycle (Fig. 1). Until now, four regulatory mechanisms have been implicated in the maintenance of Met and AdoMet homeostasis in plant cells (Goto et al., 2005). The first two processes allow a fine regulation of the metabolic flux to Met and Thr syntheses, the first two enzymes of these pathways, namely CGS and Thr synthase, competing for a common substrate, O-phosphohomo-Ser (OPH). Flux partitioning is controlled by the intracel-

lular level of AdoMet because AdoMet is an allosteric activator of Thr synthase (Curien et al., 1998, 2003) and AdoMet controls the stability of the mRNA coding CGS. Posttranscriptional control of CGS mRNA stability is mediated by a conserved region located in the N-terminal part of the CGS protein, the MTO1 (Met overaccumulation 1) domain (Chiba et al., 1999, 2003; Onouchi et al., 2005). The N-terminal region of the enzyme has also been suggested to contribute to regulate CGS and/or Met metabolism through uncharacterized posttranslational modification(s) (Hacham et al., 2002). The third mechanism accounting for the control of Met and AdoMet pools is the S-methyl-Met (SMM) cycle, which is specific for plants (Ranocha et al., 2001). In this cycle, SMM is synthesized by the AdoMet-dependent methylation of Met and can then donate a methyl group to Hcy, yielding two molecules of Met. Last, Met pool size is controlled by Met  $\gamma$ -lyase, an enzyme that catalyzes the cleavage of Met into methanethiol. Because this enzyme is expressed constitutively and up-regulated in case of Met overflow, it is assumed that Met  $\gamma$ -lyase plays an essential role in maintenance of Met and AdoMet pools (Rébeillé et al., 2006; Goyer et al., 2007).

Altogether, these data indicate a very dynamic regulation of Met homeostasis in which the role of the intracellular status of folates has never been examined. In this work we showed that 5-methyl-THF was the most dramatically reduced folate coenzyme in Arabidopsis cells exposed to antifolate drugs. As a consequence, the homeostasis of Met and derivatives was markedly affected. We showed that in cells starved for folates for a prolonged period the N-terminal domain of CGS was removed by proteolytic cleavage. This original posttranslational modification of CGS was accompanied by restoration of typical Met and AdoMet levels in folate-deficient cells.

## RESULTS

### Induction of Folate Deficiency in Arabidopsis Cells Using Antifolates

MTX and sulfanilamide are dihydrofolate and *p*-aminobenzoate analogs, respectively, that specifically inhibit THF synthesis. Sulfanilamide inhibits dihydropterote synthase whereas the target of MTX is dihydrofolate reductase (Fig. 1). These antifolates have been used to manipulate the availability of folates in plants and plant cell cultures. In particular, Prabhu et al. (1998) showed that the combined action of MTX and sulfanilamide resulted in an important reduction of Ser and Gly metabolism in Arabidopsis plants. In this study, we exposed Arabidopsis cell suspension cultures to both MTX (100  $\mu$ M) and sulfanilamide (100  $\mu$ M), and analyzed the consequences of this treatment upon the pool of folates. Folates were extracted and analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) after enzymatic deconjugation,

which converts folylpolyglutamates into the corresponding monoglutamate forms (Zhang et al., 2005). A major weakness of the analytical procedures developed for folates measurements, including the one used in this study, is the pH-dependent conversion of some species (De Brouwer et al., 2007). Thus, 5,10-methylene-THF dissociates to THF and formaldehyde, and 10-CHO-THF and 5-CHO-THF are cyclized to 5,10-methenyl-THF at various rates. Accordingly, the final quantitative LC-MS/MS data we obtained were simplified to three pools of folate: 5-methyl-THF, THF plus 5,10-methylene-THF, and other C1-substituted folates (5-CHO-THF, 10-CHO-THF, and 5,10-methenyl-THF).

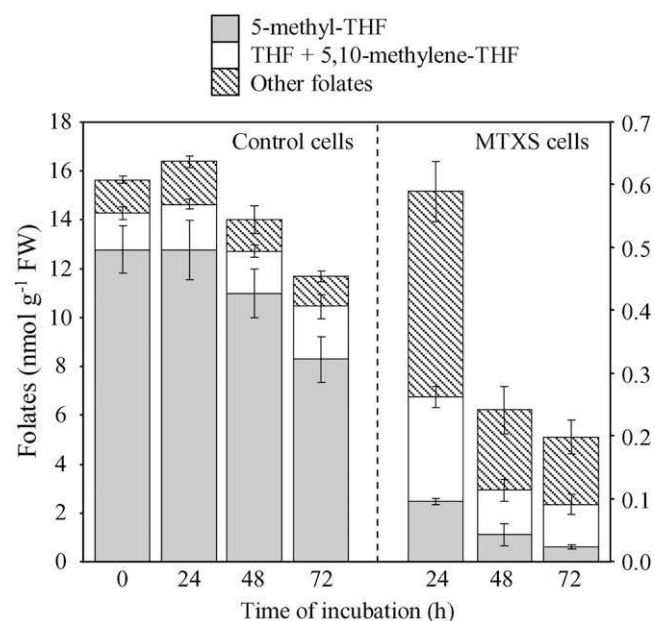
Exponentially growing *Arabidopsis* cells contained  $15.5 \pm 2.1$  nmol folates  $\text{g}^{-1}$  fresh weight (FW), with 5-methyl-THF representing 70% to 80% of the pool, THF/5,10-methylene-THF 10% to 12%, and other C1 derivatives 8% to 11% (Fig. 2). *Arabidopsis* cells treated with MTX and sulfanilamide (referred to as MTXS cells) displayed a sharp and marked (25-fold) decrease in folates content after 24 h of drugs exposure (Fig. 2). Pools measured in MTXS cells were low but comparable with folate levels recorded in plant tissues with reduced activity in C1 metabolism, namely roots, stems, hypogeal cotyledons, or fruits (0.2–1.2 nmol folates  $\text{g}^{-1}$  FW; Jabrin et al., 2003). The decline in folates pool in MTXS cells indicated that THF synthesis was strongly inhibited. This is supported by the important cellular accumulation of MTX all along the examined period (about 5–6 nmol  $\text{g}^{-1}$  FW, as measured by LC-MS/MS). Along with the establishment of folate deficiency in MTXS cells, the distribution of C1-substituted pools was also markedly affected. Indeed, the major pool corresponded to 5-CHO-THF, 10-CHO-THF, and 5,10-methenyl-THF ( $54\% \pm 4\%$ ), THF plus 5,10-methylene-THF accounted for  $31\% \pm 3\%$ , and 5-methyl-THF was reduced to  $15\% \pm 3\%$  of total folates content (Fig. 2). Thus, 5-methyl-THF was the most dramatically reduced folate coenzyme in MTXS cells (more than 100-fold decrease after 24 h of exposure to drugs). This redistribution of C1 pools probably corresponded to a re-orientation of C1 units demand in folate-deficient cells, with a probable marked impact on Met synthesis that directly depends on 5-methyl-THF supply (Fig. 1).

The growth of cells supplied with MTX and sulfanilamide was totally stopped (data not shown). This observation could be attributed mainly if not exclusively to MTX, which is known to act as an antiproliferative agent in plant cells (Wu et al., 1993). Indeed, exposure to MTX (100  $\mu\text{M}$ ) alone resulted in growth arrest of *Arabidopsis* cultures whereas cells treated with sulfanilamide (100  $\mu\text{M}$ ) alone grew similarly to control cells. Folates measurements in sulfanilamide-treated cells indicated a 2-fold reduction in folates content as compared to controls and no significant change in the distribution of C1 derivatives was observed (data not shown). To further analyze the physiological consequences of folate starvation, we measured respiration rates and determined cell viability in MTXS cultures. During the first 48 h of treatment,

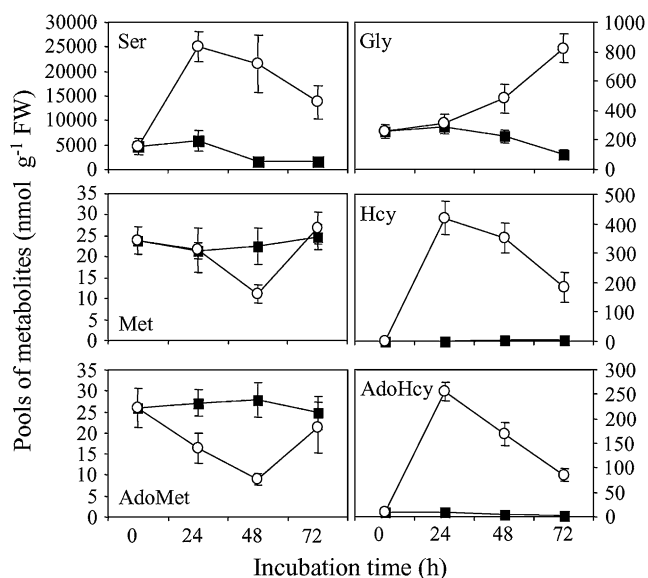
the respiration rate of MTXS cells was reduced by approximately 25% as compared to controls (see Supplemental Fig. S1). At 72 h, respiration rates were similar in both conditions; they remained stable in MTXS cells and decreased in untreated cells, probably because of Suc limitation in the medium from control cultures. During the entire period of exposure to antifolates, cell viability measured using the vital dye fluoresceine diacetate was similar in treated and control cultures ( $85\% \pm 6\%$  living cells). Taken together, these data indicated that even blocked for division, *Arabidopsis* cells exposed to MTX and sulfanilamide were viable, metabolically active, and suitable to analyze the effects of folate deficiency on the homeostasis of Met and derivatives.

#### Modification of the Pool of Ser, Gly, Met, and Derivatives in Folate-Deficient Cells

To analyze the consequences of folate starvation on metabolic profiles of *Arabidopsis* cells we measured free amino acids, thiols, AdoMet, and S-adenosylhomocyst (AdoHcy). Our analysis focused on the pools of Ser, Gly, Met, and derivatives that displayed important perturbations in MTXS versus control cells (Fig. 3). Ser, through its folate-dependent conversion to Gly by the reversible enzyme Ser hydroxymethyltransferase (Fig. 1), is the principal donor of C1 units in plants. During the first 24 h of exposure to antifolate drugs, the pool of



**Figure 2.** Analysis of folates pools in control and MTXS-treated *Arabidopsis* cells. Cells were grown in standard conditions or exposed to MTX (100  $\mu\text{M}$ ) and sulfanilamide (100  $\mu\text{M}$ ) over a 72 h period and folates were analyzed by LC-MS/MS (Zhang et al., 2005). Three pools of folates were considered: 5-methyl-THF, THF and 5,10-methylene-THF, and other derivatives (5-CHO-THF, 10-CHO-THF, and 5,10-methenyl-THF). Data are means of three to six biological replicates and sd. Note that the scale used for folates quantification is different for control and MTXS-treated cells.



**Figure 3.** Analysis of key metabolites of C1 metabolism in folate-sufficient and folate-deficient Arabidopsis cells. Free amino acids, thiols, and AdoMet/AdoHcy were extracted from control (■) and MTX-treated (○) cells collected at different time intervals and analyzed by LC as described in "Materials and Methods." Data are means  $\pm$  SD of three biological replicates.

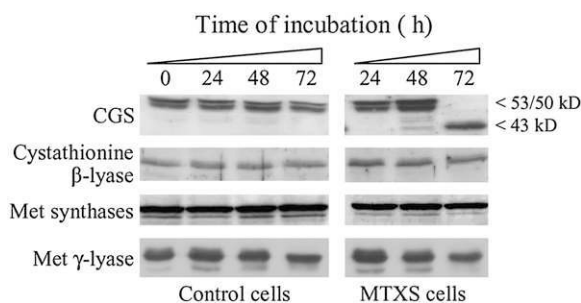
Ser in Arabidopsis cells was increased by 5-fold (Fig. 3). In the rest of the folate-starvation time course, the level of Ser was about 10-times higher in MTXS than in control cells. The catabolism of Gly by the Gly decarboxylase complex (Fig. 1) located in mitochondria is another source of C1 units through the conversion of THF to 5,10-methylene-THF. In leaves of C3 plants, coupling of Gly decarboxylase and Ser hydroxymethyl transferase activities is the key step of photorespiration, which allows transfer of the  $\alpha$ -C of one Gly molecule to a second Gly molecule for Ser synthesis. Photosynthesis and photorespiration in Arabidopsis cell cultures (mixotrophic growth) is not as high as in leaves but the catabolism of Gly through Gly decarboxylase, which is present in all cells (Mouillon et al., 1999), was affected by folate starvation. Indeed, while no significant difference in Gly pool was observed in the first 24 h of exposure to drugs, 48-h and 72-h periods were characterized by 2- and 5-fold increase in Gly content in MTXS versus control cells, respectively (Fig. 3). Taken together, our data indicated that folate deficiency in Arabidopsis cells markedly impaired Ser and Gly metabolism. These results are in accordance with a previous study showing that a continuous supply of THF is essential to maintain elevated rates of Ser hydroxymethyltransferase and Gly decarboxylase activities in Arabidopsis (Prabhu et al., 1998).

Analysis of the Hcy pool size in MTXS-treated cells indicated that Met synthesis and recycling were markedly reduced by folate deficiency. Indeed, Hcy is low abundant in control cells (about 1.5–2 nmol g<sup>-1</sup> FW) but accumulated by 250- to 300-fold in MTXS cells (Fig.

3). The accumulation of Hcy could be attributed to an impairment of the reaction catalyzed by Met synthase (Fig. 1). A similar profile was observed for AdoHcy, the by-product of AdoMet-dependent methyltransferases, which accumulated 30-fold in MTXS versus control cells (Fig. 3). The rise in AdoHcy pool size could be attributed in part to the utilization of AdoMet by methyltransferases but mainly to the activity of AdoHcy hydrolase (Fig. 1). Indeed, this enzyme is reversible and AdoHcy hydrolysis to Hcy and adenosine is only favored by removal of these products (Moffatt and Weretilnyk, 2001). In MTXS cells, if adenosine is not rate limiting, the huge accumulation of Hcy would favor AdoHcy hydrolase in the direction of AdoHcy synthesis. The variations of Met and AdoMet pools during the time course of folate starvation were different from that of Hcy and AdoHcy. In Arabidopsis cells cultured in standard medium, the Met and AdoMet contents were maintained constant (about 25 nmol g<sup>-1</sup> FW) all along the exponential growing phase (Fig. 3). In MTXS cells, the pool of AdoMet decreased by 40% and 70% after 24 and 48 h of culture, respectively. The level of Met also decreased in treated cells but after a longer delay period (2-fold reduction after 48 h of starvation). These data suggested that an impairment of the activated methyl cycle at the level of Met synthase imbalanced the rates of Met and AdoMet synthesis and utilization (protein synthesis, methylation reactions, ethylene, and polyamines syntheses). The most striking observation associated with fluctuations in Met and AdoMet was the restoration of pools characteristic of control cells after 72 h of exposure to antifolate drugs (Fig. 3). The recovery of typical levels of Met and AdoMet could not be explained by using only our metabolite profiling data. Indeed, as previously observed in Arabidopsis cell cultures (Rébeillé et al., 2006), the pool of SMM was too low to be determined in our experimental system (below 2 nmol g<sup>-1</sup> FW), and thus this amino acid could not act as a reservoir for Met and AdoMet in folate-deficient Arabidopsis cells.

#### Expression of Met-Synthesizing Enzymes in Folate-Deficient Cells

To gain insight into the fluctuations of Met and AdoMet pools in folate-deficient cells we analyzed the expression pattern of the three enzymes involved in the synthesis of Met (Fig. 1). Western-blot analyses performed using soluble protein extracts from MTXS and control Arabidopsis cells indicated that cystathionine  $\beta$ -lyase and Met synthase isoforms were expressed at constant levels in both culture conditions during the whole experimental period (Fig. 4). Thus, the oscillation of Met and AdoMet levels could not be attributed to modifications of the expression of the second (cystathionine  $\beta$ -lyase) and third (plastid Met synthase) enzymes involved in de novo Met synthesis in plastids, neither to the expression of the cytosolic Met synthases involved in the recycling of Met in the



**Figure 4.** Expression of the enzymes involved in Met synthesis and catabolism in folate-sufficient and folate-deficient cells. Soluble proteins (40  $\mu$ g per lane) from *Arabidopsis* cells grown in standard medium (control cells) or exposed to 100  $\mu$ M MTX and 100  $\mu$ M sulfanilamide (MTXS cells) were analyzed by western blot using antibodies raised against CGS, cystathionine  $\beta$ -lyase, Met synthases, and Met  $\gamma$ -lyase from *Arabidopsis*. The 53- and 50-kD polypeptides detected with the CGS serum are characteristic of the mature enzyme, the one at 43 kD being observed only in cells starved for folates for 72 h. Quantitation of CGS polypeptides using chemiluminescence detection reagents and a Typhoon 9400 scanner indicated that the amount of CGS protein was increased by 2-fold between 24 and 48 h of treatment and was maintained constant between 48 and 72 h (titration experiments using recombinant proteins indicated that the signal obtained with the 43-kD polypeptide of CGS was reduced by 30%–40% as compared with the signal measured for the mature protein). The antibodies against Met synthase cross-react with both the cytosolic (top band) and chloroplastic (bottom band) isoforms of the enzyme (Ravanel et al., 2004a).

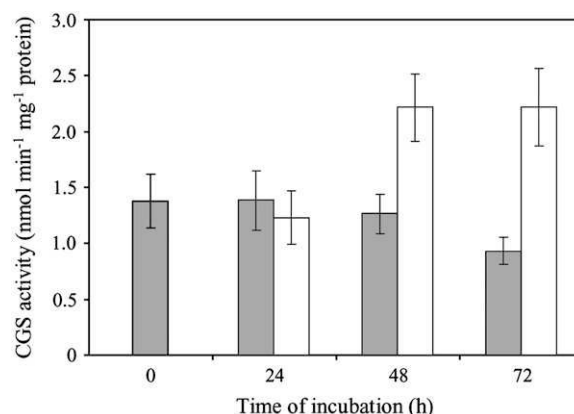
activated methyl cycle. The expression pattern of CGS was more fluctuating. It is worth noting that immunodetection or purification of CGS in various plant species resulted in two polypeptides encoded by the same gene (*CGS1*, *At3g01120* in *Arabidopsis*; Ravanel et al., 1998; Hacham et al., 2006). The first polypeptide migrates with the expected size of the mature CGS (MCGS; 53 kD) while the second has an estimated size of 50 kD. Recently, Hacham et al. (2006) showed that the 50-kD polypeptide resulted from the translation of a CGS transcript bearing a deletion of 90 or 87 nucleotides (about 3 kD located internally in the N terminus of the enzyme). In control *Arabidopsis* cells, the two polypeptides characteristic for CGS were expressed at constant levels during the first 48 h of culture and then the amount of enzyme was slightly reduced at 72 h (Fig. 4). In folate-deficient cells, CGS expression level was comparable to control cells at 24 h but was increased by approximately 2-fold after 48 h of exposure to antifolates (Fig. 4). After a 72 h period of treatment, the 53- and 50-kD CGS bands were not detected but the CGS antiserum cross-reacted with a polypeptide of  $43 \pm 1$  kD. The accumulation of CGS polypeptides at 48 h could be attributed to a perturbation of the AdoMet-dependent feedback regulation of the expression of the *CGS1* gene (Goto et al., 2005). Indeed, we can assume that the decrease in AdoMet level in MTXS cells (9 nmol  $g^{-1}$  FW at 48 h versus 28 nmol  $g^{-1}$  FW in control cells, see Fig. 3) would increase *CGS1* mRNA stability, thus allowing mRNA and pro-

tein to accumulate. After 72 h of folate starvation, the concomitant disappearance of CGS at 53/50 kD and detection of the 43-kD polypeptide could not be attributed to this regulatory process. A global proteolytic degradation of proteins in MTXS cells could also be rejected because (1) Coomassie Brilliant Blue staining of protein extracts after SDS-PAGE displayed typical patterns (data not shown), and (2) immunodetection of cystathionine  $\beta$ -lyase, Met synthases, and Met  $\gamma$ -lyase in these extracts was not affected (Fig. 4).

To validate the expression patterns described above, we measured CGS activity using desalted soluble protein extracts prepared from MTXS and control cells. Because CGS activity is low in plant extracts, cystathionine production was monitored by HPLC after derivatization with *O*-phthaldialdehyde. As shown in Figure 5, CGS activity measured in control cells matched the expression profile of the protein (Fig. 4), with constant cystathionine production during the first 48 h of culture followed by a 30% decrease at 72 h. Also, CGS activity measured in MTXS cells after 24 and 48 h of exposure to drugs fitted well with immunoblots (Fig. 5). More importantly, the 2-fold increase in CGS activity measured at 48 h was maintained at 72 h, thus indicating that the 43-kD polypeptide detected by western blot corresponded to an active CGS enzyme with a modified electrophoretic behavior.

#### Expression of Met $\gamma$ -Lyase in Folate-Deficient Cells

It has been shown recently that Met  $\gamma$ -lyase, which catalyzes Met degradation into methanethiol,  $\alpha$ -ketobutyrate, and ammonia, plays an important role in controlling Met homeostasis in plants (Rébeillé et al., 2006; Goyer et al., 2007). To determine whether this enzyme could participate to the oscillation in Met pool size we analyzed its expression in folate-sufficient



**Figure 5.** CGS activity in control and MTXS-treated *Arabidopsis* cells. Soluble proteins were extracted from control (gray bars) and MTXS-treated (white bars) cells collected at different time intervals, desalted through Sephadex G25, and CGS activity was determined by LC after derivatization of cystathionine. Data are means  $\pm$  SD of three biological replicates.

and folate-deficient cells by western blot. The expression patterns observed in both conditions were similar (Fig. 4), indicating that even if the production of the enzyme is increased in *Arabidopsis* cells accumulating Met (Rébeillé et al., 2006), Met  $\gamma$ -lyase was not down-regulated in a situation of Met limitation. Thus, restoration of Met and AdoMet pools after 72 h of folate starvation was not a result of a decreased catabolism of Met.

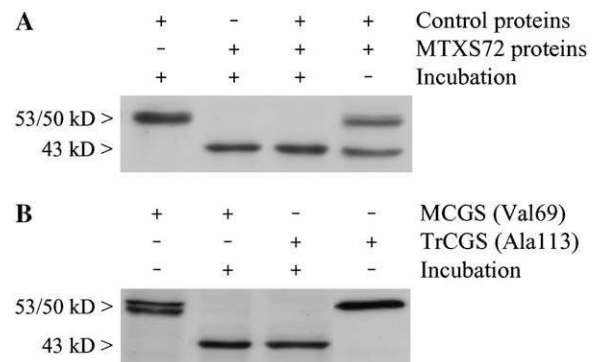
#### The N-Terminal Domain of CGS Is Cleaved in Folate-Deficient Cells

Several hypotheses were envisaged to explain the origin of the 43-kD CGS polypeptide detected in cells starved for folates. First, transcription of the *CGS1* gene (*At3g01120*) could be affected to generate an unusual deleted transcript (e.g. distinct transcription start site and/or alternative splicing). Second, the *Arabidopsis* genome contains a second gene (*At1g33320*) coding a putative CGS enzyme, which differs from the *CGS1*-encoded protein by the absence of 151 residues in the N-terminal region (including the transit peptide and the MTO1 domain). Although the absence of expressed sequence tag for *At1g33320* in The *Arabidopsis* Information Resource database ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) suggests that this gene may not be expressed, the predicted molecular mass of this putative CGS (46 kD, 412 residues) could correspond to the polypeptide detected by western blot in folate-deficient cells. Third, the 43-kD polypeptide could originate from MCGS (53/50 kD) through a proteolytic cleavage. To test this last hypothesis, we used soluble proteins obtained from cells treated with MTX and sulfanilamide for 72 h (MTXS72) as a source of the hypothetical CGS-specific cleavage system. The combination of MTXS72 proteins with proteins extracted from control cells resulted, upon incubation for 2 h at 25°C, in the conversion of the 53/50-kD bands of MCGS into the 43-kD polypeptide (Fig. 6A). These data indicated that CGS was subjected to a posttranslational cleavage in folate-deficient cells. This result was confirmed using recombinant CGS proteins purified from *Escherichia coli* overproducing cells. Two versions of recombinant CGS were tested as substrates for the CGS-cleavage machinery existing in MTXS72 extracts. The first enzyme corresponded to MCGS (starting with Val-69; Ravanel et al., 1998), the second was a truncated form with a deletion of 44 residues at the N terminus of the protein (starting with Ala-113 and thus lacking the MTO1 domain; G. Curien, unpublished data). Incubation of the two recombinant CGSs with the MTXS72 protein extract resulted in the same cleavage product at  $43 \pm 1$  kD (Fig. 6B). Because the two versions of CGS differed only by their N-terminal regions, this result indicated that the posttranslational cleavage of CGS occurred at the N terminus of the enzyme.

To further characterize the posttranslational modification affecting MCGS, we first tested the effect of several inhibitors acting on the four major classes of

proteases, namely metallo proteases (EDTA 20 mM, 1,10-phenanthroline 5 mM), thiol proteases (E64 50  $\mu$ M), Ser proteases (phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 5 mM), and aspartic proteases (pepstatin A 10  $\mu$ M). With the exception of PMSF that fully abolished MCGS cleavage, none of the inhibitor tested had significant effect on the production of the 43-kD CGS polypeptide in our experimental conditions (see Supplemental Fig. S2). This suggested that at least a Ser protease was involved. In another set of experiments, the different constituents of the reconstituted *in vitro* cleavage assay were treated at 100°C for 5 min before combining the substrate/protease(s) fractions. Heat denaturation of the MTXS72 extract fully abolished the cleavage of CGS (Supplemental Fig. S2), thus confirming the enzymatic nature of the process. On the other hand, heat denaturation of native or recombinant MCGS did not impair processing of the N-terminal domain of the enzyme by a MTXS72 extract and, moreover, did not lead to a complete degradation of the enzyme (the proteolytic product was the characteristic 43-kD polypeptide; Supplemental Fig. S2). These data suggested that the secondary structure of the N terminus of CGS is not important for recognition by the proteolytic system or that this part of the protein is naturally unfolded or highly thermostable.

To identify the cleavage site in the N-terminal domain of CGS we used the following strategy. MCGS was overproduced in *E. coli* as a fusion protein with a C-terminal His tag and purified by affinity chromatography on Ni-agarose column (see "Materials and Methods"). Pure recombinant MCGS-6His was combined



**Figure 6.** Evidence for posttranslational cleavage of the N-terminal region of MCGS in folate-deficient cells. A, Soluble proteins prepared from control cells were mixed with an equal amount of proteins from cells treated with MTXS for 72 h (MTXS72) and incubated for 2 h at 25°C. Forty micrograms of proteins were analyzed in each lane. B, Pure recombinant CGS enzymes (25 ng) were incubated for 2 h at 25°C with 2.5  $\mu$ g soluble proteins from MTXS72 cells. Two versions of the enzyme were analyzed: the MCGS (starting with Val-69) and a truncated CGS (TrCGS, starting with Ala-113) bearing a deletion of 44 residues at the N terminus of the protein. Each combination from sections A and B was analyzed by western blot with polyclonal antibodies raised against CGS. Note that in B only the recombinant CGSs are detected because they are present in excess as compared to the enzyme provided by the MTXS72 extract.

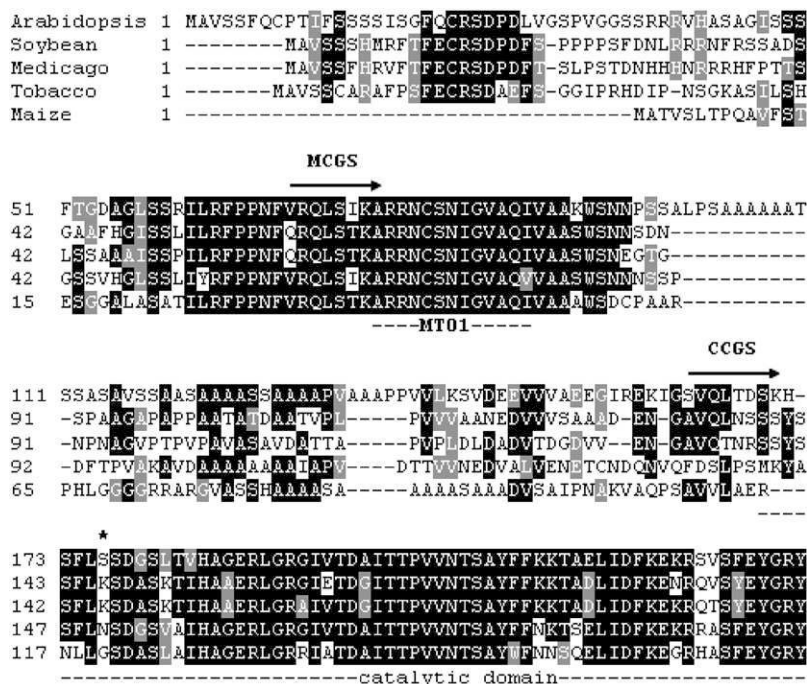
with a MTXS72 protein extract, incubated until all the protein has been cleaved, and the mixture was applied onto a Ni-agarose column. Cleaved MCGS-6His was then eluted from the column as a pure protein and subjected to Edman's degradation. The N-terminal sequence obtained (SVQLTDSK) corresponded to residues 161 to 168 of CGS. The truncated enzyme derived from MCGS, now referred to as CCGS for cleaved CGS, is a 403-residue protein with a theoretical  $M_r$  of 43,988 D. Thus, processing of MCGS to CCGS in folate-deficient Arabidopsis cells corresponds to the removal of 92 residues at the N terminus of the mature enzyme. An alignment of the amino acid sequences of CGS from different plant species is shown in Figure 7. This comparison revealed interesting features on the N-terminal domain of CGS and the consequences of its elimination. First, the highly conserved MTO1 domain that is implicated in the posttranscriptional regulation of *CGS1* transcript stability by AdoMet (Chiba et al., 1999, 2003; Onouchi et al., 2005) is removed in CCGS. Second, the region located between the end of the MTO1 domain and the site of cleavage (Ser-161) is poorly conserved, particularly in plants from different families and genus (e.g. maize [*Zea mays*] versus Arabidopsis), and consists of Ala repeats typical of low-complexity sequences. Thus, a canonical consensus cleavage site cannot be determined. Third, removal of the N-terminal domain of CGS does not affect the catalytic core domain of the enzyme, as determined using the three-dimensional structure of CGS from tobacco (*Nicotiana tabacum*; Steegborn et al., 1999), suggesting therefore that CCGS is active. This is supported by the observation that the CCGS enzyme

detected in MTXS72 protein extracts was associated with CGS activity (see Figs. 4 and 5).

### Comparison of the Kinetic Properties of MCGS and CCGS

The above-mentioned data indicated that the N-terminal domain of CGS is not essential for catalytic activity. To analyze further the role of this domain and its processing in folate-deficient cells, we compared the biochemical and kinetic properties of MCGS and CCGS. To this aim, we purified both proteins fused with a C-terminal His tag and overproduced in *E. coli* cells. First, gel filtration experiments indicated that both forms of the enzyme behave as tetramers (data not shown), thus indicating that the oligomerization of CGS was not affected by its N-terminal region. Second, steady-state kinetic analyses were consistent with Michaelis-Menten behavior for both MCGS and CCGS. The kinetic parameters of the two enzymes were similar, with apparent  $V_{max}$  of  $8.5 \pm 0.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein, and  $K_m$  values of  $2.3 \pm 0.4 \text{ mM}$  and  $500 \pm 70 \mu\text{M}$  for OPH and Cys, respectively. Thus, removal of the N terminus of CGS did not modify the catalytic efficiency of the enzyme.

We have previously shown that several metabolites associated with the metabolism of Met (namely cystathionine, Hcy, Met, AdoMet, AdoHcy, SMM, 5-methylthioadenosine, Thr, and Ile) did not regulate Arabidopsis MCGS activity (Ravanel et al., 1998). These metabolites have been tested separately at elevated (nonphysiological) concentrations in a standard enzyme assay containing saturating substrate levels

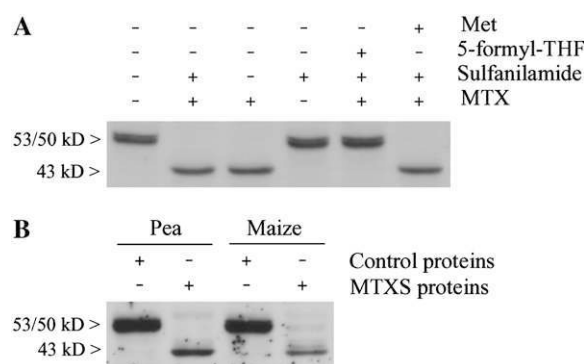


**Figure 7.** Alignment of amino acid sequences of the N-terminal region of CGS from various plant species. The alignment was generated with ClustalW using the amino acid sequences of CGS from Arabidopsis (GenBank accession no. ATU83500), soybean (*Glycine max*; AAD34548), *Medicago truncatula* (ABE79443), tobacco (AB035300 and AF097180), and maize (AAB61347). Only the N-terminal region of CGSs is shown in the alignment. The mature (MCGS) and cleaved (CCGS) versions of the Arabidopsis enzyme start with residues Val-69 and Ser-161, respectively. The MTO1 (Goto et al., 2005) and catalytic (Steegborn et al., 1999) domains are underlined. The truncated Arabidopsis CGS enzyme overexpressed in transgenic tobacco plants by Hacham et al. (2002) starts with Ser-173 (asterisk).

(1 mM Cys and 10 mM OPH). Because the cleavage of the N terminus of CGS did not change the catalytic properties of the enzyme, we reexamined the possibility of CGS regulation by feedback inhibition or activation using *in vitro* assay conditions mimicking the metabolite pools that exist *in vivo*. To set up these assays at near physiological conditions, we fixed the concentration of CGS substrates at 100  $\mu\text{M}$  and used two sets of putative effectors: the one corresponding to folate-sufficient cells (20  $\mu\text{M}$  Met, 25  $\mu\text{M}$  AdoMet, 8  $\mu\text{M}$  AdoHcy, 2  $\mu\text{M}$  Hcy, 10  $\mu\text{M}$  5-methyl-THF<sub>Glu-5</sub> [pentaglutamate form], Ser 3 mM, and Gly 250  $\mu\text{M}$ ), the other mimicking folate-deficient cells (10  $\mu\text{M}$  Met, 10  $\mu\text{M}$  AdoMet, 200  $\mu\text{M}$  AdoHcy, 350  $\mu\text{M}$  Hcy, 0.05  $\mu\text{M}$  5-methyl-THF<sub>Glu-5</sub>, Ser 25 mM, and Gly 550  $\mu\text{M}$ ). Kinetic data indicated that none of the metabolite mixtures used had significant effect on MCGS or CCGS activity (maximal changes were about 10%–15% for both enzymes). To analyze the effect of more complex metabolite mixtures on CGS activity, we collected the salt fractions issued from desalting of protein extracts by gel filtration on Sephadex G-25. Salt fractions significantly inhibited CGS activity in a dose-dependent manner but (1) MCGS and CCGS were similarly affected, and (2) salts obtained from folate-sufficient or folate-deficient cells produced similar effects on both enzymes. It is likely that these inhibitions were due to the previously observed sensitivity of CGS to a variety of salts (Ravanel et al., 1995) rather than to a specific regulation through feedback regulators. To support this assumption, we verified that MCGS and CCGS activities were inhibited by KCl in similar ways (50% inhibition at about 20 mM). Together, these data did not allow us to identify metabolites that could interact *in vitro* with the N-terminal domain of CGS and modify its kinetic behavior.

#### Cleavage of the N-Terminal Domain CGS Is Specifically Associated with Perturbation of the Folates Pool and Occurs in Various Plant Species

To gain insight into the physiological situations that trigger the cleavage of the N-terminal region of CGS, we analyzed the behavior of the enzyme in *Arabidopsis* cells cultured in different conditions. First, we showed that processing of the N terminus of MCGS occurred in cells only in conditions of folate deficiency. Indeed, CCGS was produced in cells treated with a combination of MTX and sulfanilamide (each at 100  $\mu\text{M}$ ) or MTX alone (at 100  $\mu\text{M}$ ), but not in cells in which the folate pool was reduced by 2-fold by using sulfanilamide (100  $\mu\text{M}$ ) alone (Fig. 8A). We also performed rescue experiments using 5-CHO-THF to determine whether the cleavage of CGS was attributable to folate deficiency or to another effect of MTX. In a separate control experiment we showed that *Arabidopsis* cells cultured with 5-CHO-THF, a chemically stable folate derivative, gradually accumulated large amounts of folates (up to 350 nmol g<sup>-1</sup> FW after 72 h of incubation), among which 5-methyl-THF accounted for 24%



**Figure 8.** Processing of the N-terminal domain of CGS is specifically associated with folates starvation and occurs in several plant species. **A**, Soluble protein extracts were prepared from *Arabidopsis* cells grown for 72 h in culture medium supplemented with the following compounds, alone or in combination: 100  $\mu\text{M}$  MTX, 100  $\mu\text{M}$  sulfanilamide, 0.5 mM 5-formyl-THF, and 1 mM Met. Soluble proteins (30  $\mu\text{g}$ ) were extracted and analyzed by western blot with polyclonal antibodies against CGS. **B**, Leaf discs from pea and maize were floated for 8 d in petri dishes containing control medium or supplied with both MTX (100  $\mu\text{M}$ ) and sulfanilamide (100  $\mu\text{M}$ ). Soluble proteins (5  $\mu\text{g}$ ) prepared from control or MTXS-treated leaf discs were combined with an *Arabidopsis* protein extract (20  $\mu\text{g}$ ) containing MCGS and incubated for 1 h at 25°C before performing immunoblot analysis.

to 36% of the total pool (data not shown). As shown in Figure 8A, the supply of 5-CHO-THF abolished the cleavage of CGS in cells treated with MTX and sulfanilamide. Because the homeostasis of several metabolites linked to Met metabolism was markedly perturbed in folate-deficient cells, we further tested the ability of a Met supply to suppress CGS processing. In a previous study, we showed that *Arabidopsis* cells fed with Met accumulated large amounts of Met and had an AdoMet pool size increased by 10-fold (Rébeillé et al., 2006). When MTXS-treated cells were supplied with exogenous Met, processing of the N-terminal domain of CGS was not abolished (Fig. 8A). Together, these data indicated that the posttranslational modification of CGS occurred only in cells markedly starved with folates and that replenishment of Met and AdoMet pools through exogenous Met application was ineffective to counter this process.

To determine whether the production of CCGS occurred in situations different from folate deficiency we exposed *Arabidopsis* cultures to different stresses. To this aim, cells were supplied with 100 mM NaCl or 44 mM hydrogen peroxide to induce salt and oxidative stresses, respectively (Sweetlove et al., 2002; Kim et al., 2007). Also, sulfur deficiency was induced by growing cells in medium with limiting sulfur (73  $\mu\text{M}$  instead of 1.7 mM in standard conditions, see "Materials and Methods"). Western-blot analyses indicated that salt stress, oxidative stress, and sulfur starvation were not associated with the presence of CCGS (see Supplemental Fig. S3). Therefore, it is likely that none of the important metabolic changes that occur in these situations

could mimic the metabolic status of folate-deficient cells and trigger cleavage of the N terminus of CGS.

To examine whether the cleavage of MCGS to CCGS was a conserved regulatory process in several plant species we induced folate deficiency in leaves detached from Arabidopsis, pea (*Pisum sativum*), or maize plants and floated on a solution of MTX and sulfanilamide (100  $\mu$ M of each drug). After 6 d of incubation, CCGS was detected in MTXS-treated Arabidopsis leaves whereas MCGS was present in control leaves, thus indicating that the situation observed in cell suspension cultures holds true in leaves. This situation could not be observed in pea and maize leaf extracts because the antibodies against Arabidopsis CGS did not cross-react with CGS from these plants. To overcome this problem, we used the in vitro combination assay described above (Fig. 6) to examine the ability of proteins extracts from pea and maize leaves treated with MTX and sulfanilamide to cleave MCGS from Arabidopsis. As shown in Figure 8B, folate starvation in pea and maize leaves induced a proteolytic machinery that is able to remove the N-terminal domain of the Arabidopsis CGS. These data indicated that this regulatory process is widespread in the plant kingdom and not limited to Arabidopsis.

## DISCUSSION

In all living organisms, control of folate homeostasis is of vital importance to sustain the demand for C1 units that are essential in several major metabolic pathways. In this study we induced folate deficiency in Arabidopsis cells by using two inhibitors of THF synthesis. This treatment triggered a rapid and important decrease in the pool of folates with significant modification in the distribution of C1-substituted folate coenzymes. These data indicated that the synthesis of THF was strongly inhibited and that the catabolism of folates was important. Using Arabidopsis plants exposed to sulfanilamide, Orsomando et al. (2006) estimated a total folate breakdown rate of about 10% per day. In our experimental system, Arabidopsis cells exhibited folate catabolism rate of at least 4% per hour. As previously observed by Prabhu et al. (1998), it thus appears that MTX triggers more important perturbations of folate homeostasis (synthesis, recycling, and catabolism) than sulfanilamide, most probably because the later inhibitor blocks only de novo synthesis of THF whereas MTX also affects rereduction of dihydrofolate to THF by the enzyme dihydrofolate reductase. In Arabidopsis cells exposed to MTX and sulfanilamide, depletion was more pronounced for 5-methyl-THF (>100-fold decrease at 24 h) than for THF and 5,10-methylene-THF (10-fold) or 5-CHO-THF, 10-CHO-THF, and 5,10-methenyl-THF (5-fold). This suggested an adaptive response to favor a preferential shuttling of the flux of C1 units to the synthesis of purines and thymidylate over the synthesis and recycling of Met. Despite these changes, folate-deficient

cells stopped to divide, suggesting that nucleotides synthesis was limiting. Further investigations, including analysis of the expression of key genes involved in C1 metabolism, will be necessary to decipher accurately the metabolic priorities associated with folate deficiency in Arabidopsis.

Metabolic profiling of folate-deficient cells indicated important perturbation of the activated methyl cycle because of the impairment of Met synthase enzymes that are deprived of their substrate 5-methyl-THF. The immediate consequences of this blockage are the accumulation of Hcy, and then the increase in AdoHcy pool owing to the reversible activity of AdoHcy hydrolase. The pools of AdoMet and particularly Met are more robust to these perturbations, suggesting that the demands for these metabolites in anabolic reactions are also altered by folate deprivation. In regard, MTXS-treated cells ceased to divide and probably reduced their demand for Met to synthesize proteins. Also, it must be stressed that the methyl index (AdoMet to AdoHcy ratio) was 100-fold lower in folate-deficient than in folate-sufficient cells, which suggests an important impairment of AdoMet-dependent methyltransferase reactions. Indeed, AdoHcy strongly inhibits methyltransferases through competition with the substrate AdoMet (Moffatt and Weretilnyk, 2001).

The most intriguing result from our metabolic analysis was the restoration of typical pools of Met and AdoMet after a prolonged period of folate starvation. We propose that the adaptive response of Arabidopsis cells to reestablish Met and AdoMet homeostasis under folate-limiting conditions involves two mechanisms. First, the posttranscriptional regulation of the CGS1 gene coding CGS (Chiba et al., 1999, 2003; Onouchi et al., 2005) is affected by the decrease in AdoMet content, thus leading to a 2-fold increase in CGS protein and activity at 48 h (Figs. 4 and 5). Loosening of the AdoMet-dependent CGS1 mRNA degradation was probably not sufficient however to improve de novo synthesis of Met after long-term folate deficiency. Indeed, this period is characterized by a previously unknown posttranslational regulation of CGS that consists in the removal of 92 amino acids at the N terminus of the enzyme. Kinetic analyses conducted in vitro using pure recombinant enzymes or cellular protein extracts failed to detect any catalytic improvement of CGS as a consequence of N-terminal processing. However, the situation proved to be different in vivo. Indeed, to determine the function of the N-terminal region of CGS, Hacham et al. (2002) have generated transgenic tobacco plants overproducing the mature Arabidopsis CGS or a truncated version of the enzyme. Transgenic plants expressing truncated CGS, which starts 12 residues after the cleavage site we identified (Fig. 7), produced higher amounts of Met (free or in proteins) than plants expressing the mature version of the enzyme and emitted high levels of ethylene and Met catabolic products. Because similar levels of the enzyme were produced in both transgenic lines and since no significant difference was observed



regarding CGS transcript or protein stability, it was concluded that the N-terminal region of CGS plays an important regulatory role in Met metabolism in Arabidopsis (Hacham et al., 2002). The concomitant processing of CGS with restoration of Met and AdoMet pools in folate-deficient cells agree with this finding and demonstrate moreover that this regulatory domain of CGS can be processed in vivo to favor Met and then AdoMet production. This suggests also that, in our experimental conditions, the 2-fold increase in CGS protein and the posttranslational processing of the enzyme were essential to allow restoration of Met and AdoMet pools albeit the limitation downstream in the pathway, at the level of Met synthase. To strengthen this hypothesis, it is worth noting that the  $K_m$  values for 5-methyl-THF of the chloroplastic Met synthase is 4-fold lower than that of the cytosolic isoforms (Ravanel et al., 2004a), thus suggesting that de novo synthesis of Met in plastids is less affected by folate deprivation than recycling of Met in the cytosol. The essential role attributed to CGS processing is also supported by the observation that the key enzyme involved in the catabolism of Met, Met  $\gamma$ -lyase, was not down-regulated in folate-deficient cells and thus could not contribute to restoration of Met and AdoMet levels.

These findings suggest that CGS activity could be regulated in vivo via a feedback inhibition involving the interaction of one or several metabolites with the N-terminal domain of the enzyme (Hacham et al., 2002). We tested this hypothesis in vitro using pure recombinant MCGS and CCGS proteins and several metabolites for which pools were markedly affected in folate-deficient cells. In particular, we analyzed the effect of AdoMet and 5-methyl-THF, alone or in combination, on both versions of the enzyme. These metabolites were of particular interest because Selhub et al. (1971) have shown that, in *Neurospora crassa*, 5-methyl-THF acts as an essential activator of CGS and antagonizes the feedback inhibition of the enzyme by AdoMet. Also, plant and *Neurospora* CGSs share a common feature as they possess an N-terminal extension of about 180 to 200 residues that is not found in bacterial CGS. Our kinetic data indicated that CGS from Arabidopsis is not regulated in vitro by AdoMet or 5-methyl-THF. Also, all the other metabolites tested at physiological or elevated concentrations (Met, AdoHcy, Hcy, Ser, Gly, reduced, or oxidized glutathione) did not result to any significant modification of MCGS or CCGS activity. These data, together with previous inhibition studies (Ravanel et al., 1998), failed to identify a metabolic effector of plant CGS. We cannot rule out the possibility, however, that some other metabolites (e.g. ethylene or other anabolic or catabolic products derived from Met) can modulate CGS activity through an interaction with the N terminus of the enzyme and that removal of this domain can suppress this regulation. One example of such a regulation has been described for human cystathionine  $\beta$ -synthase, the first enzyme of the pathway leading

to the conversion of Hcy to Cys. It was proposed that the catalytic site of cystathionine  $\beta$ -synthase is partially occluded by the C-terminal autoregulatory domain and that AdoMet binding or proteolytic cleavage displace this domain, thus increasing the enzyme catalytic activity (Miles and Kraus, 2004). Although there are many similarities between the regulatory process described for human cystathionine  $\beta$ -synthase and the processing of Arabidopsis CGS, further studies will be required to improve our knowledge about the regulatory function of the N-terminal domain of the plant enzyme. In particular, we will have to consider the possibility that this regulatory process involves a protein partner or posttranslational modification, which was not present in our in vitro assays that contain only pure recombinant CGS enzymes.

Among the various molecules tested for their ability to inhibit the proteolytic system acting on CGS, only PMSF was able to prevent the cleavage. This result, together with the localization of CGS in the stroma, suggests that at least one chloroplastic Ser protease is involved in the processing of the enzyme. The occurrence of CGS processing outside the chloroplast, i.e. before import of the protein precursor into plastids, is unlikely because (1) its substrate OPH is synthesized only in plastids, (2) the next enzyme involved in de novo Met synthesis is only located in plastids (Ravanel et al., 1996), and (3) the truncated CGS enzyme that is responsible for important perturbation of Met homeostasis in transgenic tobacco plants was expressed in plastids (Hacham et al., 2002). For similar reasons, the possibility that CGS processing may have induced a change in the subcellular location of the enzyme is improbable. As a result of the complete sequencing of the Arabidopsis genome, most (if not all) of the chloroplastic proteases are known (Adam et al., 2006). Among them, several members of the major protease families Clp and DegP, as well as the SppA and Lon proteases, are Ser-type enzymes located in the stroma or attached to the stromal side of the thylakoid membranes. Although the physiological function of some components of the complex proteolytic machinery in plastids has been determined (Adam et al., 2006), data available to date are not sufficient to identify candidate(s) responsible for CGS processing, which is observed only in folate-deprived cells. However, we obtained preliminary data about the mechanism of substrate recognition that will be helpful in the future to identify the enzyme that is involved in CGS processing. First, the three-dimensional structure of CGS from tobacco indicated that the N-terminal region protrudes from the globular body of each monomer of the enzyme (Steegborn et al., 1999), suggesting that this domain is freely accessible to the protease(s) or a regulatory subunit. Second, the N terminus of CGS is probably structurally disordered because (1) it is not visible in the electron density map (Steegborn et al., 1999), and (2) heat denaturation of the enzyme does not abolish CGS recognition and processing by the protease(s). Third, the only part of the N-terminal

domain that is highly conserved among plant CGSs, the MTO1 domain (Goto et al., 2005), is not necessary for recognition of the enzyme by the proteolytic system, although it may be requested for the regulatory function of the N-terminal domain of CGS. Last, although the cleavage site is not canonical, the proteases expressed in response to folate starvation in different plant sources (i.e. pea and maize) are able to process correctly the Arabidopsis enzyme.

The intracellular signal that triggers proteolytic removal of the N-terminal regulatory domain of CGS is yet unknown. However, comparison of the metabolic profiles established in various situations with the presence of the mature or cleaved form of the enzyme allowed us to establish a short list of putative candidates. It was shown that sulfur deficiency in Arabidopsis led to important decrease in the levels of sulfur-related metabolites Cys, glutathione, and AdoMet, whereas the pool of AdoHcy remained unchanged (Nikiforova et al., 2005). Also, a time-course metabolic profiling in Arabidopsis cells after salt stress treatment indicated a 40% reduction in the AdoMet pool, a 70% increase in AdoHcy level, and a constant amount of 5-methyl-THF throughout the examined period (Kim et al., 2007). In these two particular situations we did not observe any processing of CGS, suggesting that perturbations were not capable to induce posttranslational regulation of the enzyme. Thus, at this stage of this study, the metabolic signature that is typical to cells expressing a processed form of CGS resides in (1) an important reduction of folates pool, mainly 5-methyl-THF; (2) an elevated level of Hcy; and (3) an increased AdoHcy pool size associated with a marked reduction of the methyl index. One can hypothesize that these metabolic changes are potential intracellular sensors that trigger, alone or in combination, posttranslational regulation of CGS. Identification of the gene(s) coding the proteolytic machinery involved in CGS processing and analysis of its expression pattern should contribute to a better understanding of the physiological conditions in which this original regulatory process controls Met homeostasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Plants, Cells, and Growth Conditions

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*; ecotype Columbia) cell suspension cultures were grown under continuous light ( $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at  $22^\circ\text{C}$  with rotary agitation at 125 rpm in Gamborg's B5 medium supplemented with  $1 \mu\text{M}$  2-naphthalene acetic acid and 1.5% (w/v) Suc. Cells were subcultured every 7 d. Arabidopsis (ecotype Columbia) plants were grown for 3 weeks in potting soil irrigated with water ( $22^\circ\text{C}$  with a 16-h photoperiod and a light intensity of  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Pea (*Pisum sativum* L. var. Douce Provence) and maize (*Zea mays* 'Furio') were grown for 2 weeks in vermiculite irrigated with water under a 12-h photoperiod ( $140 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) at  $22^\circ\text{C}$  (day) and  $20^\circ\text{C}$  (night).

Chemicals were solubilized in MES-KOH 10 mM, pH 5.6, filter sterilized, and added to cells cultures at the beginning of exponential growing phase (3 d after subcloning). To generate a sulfur-limiting medium, sulfate-containing salts (1.5 mM) were replaced with equimolar amounts of chloride salts and  $\text{FeSO}_4/\text{Na-EDTA}$  (0.1 mM) was replaced by Fe-citrate/Na-EDTA. The unique sulfur source left in this modified medium was from sulfur-containing

microelements ( $73 \mu\text{M}$ ). One-week-old Arabidopsis cells were subcultured in sulfur-deficient medium and analyzed after 3 to 7 d of sulfur starvation. Leaves from Arabidopsis and leaf discs from pea and maize were floated in petri dishes containing MES-KOH 10 mM, pH 5.6, supplemented with  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  Murashige and Skoog Basal medium (Sigma-Aldrich) and incubated at  $22^\circ\text{C}$  under continuous light ( $40 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). At each time point cells or leaf materials were collected, extensively washed with distilled water, weighted, and frozen in liquid nitrogen.

### Measurements of Respiration and Cell Viability

Measurements of respiration rate were done in 1 mL of Gamborg's B5 medium and oxygen consumption was determined in the darkness using an  $\text{O}_2$  electrode (Hansatech, Eurosep Instruments) at  $25^\circ\text{C}$ . Cell viability assays were performed using protoplasts prepared from Arabidopsis cells. Fluorescein diacetate was added to protoplasts (final concentration  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), followed by incubation at room temperature for 5 min. Samples were then placed on ice for 5 min and analyzed by epifluorescence microscopy using Green Fluorescent Protein filter sets (Zeiss Axioplan 2, Le Pecq). Cell viability was estimated as the ratio between fluorescing (living) protoplasts versus total protoplasts counted using bright-field illumination.

### Protein Extraction and Western-Blot Analysis

Plant material was ground in liquid nitrogen and total soluble proteins were extracted in 20 mM Tricine (pH 7.5), 10 mM 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, and an EDTA-free complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, catalog no. 11873580001). Samples were centrifuged at  $16,000\text{g}$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$  and the supernatant was used as a source of soluble proteins. Protein concentrations were estimated by the method of Bradford (Bradford, 1976) using the Bio-Rad protein assay reagent with bovine serum albumin as standard. Proteins were resolved by SDS/PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue or electroblotted to nitrocellulose membrane. Membranes were probed with polyclonal antibodies raised against recombinant Arabidopsis CGS (Ravel et al., 1998), cystathionine  $\beta$ -lyase (Ravel et al., 1996), Met synthase (Ravel et al., 2004a), and Met  $\gamma$ -lyase (Rébeillé et al., 2006). Detection was performed by chemiluminescence. For N-terminal protein sequence determination, purified proteins were resolved by SDS/PAGE, electroblotted to polyvinylidene difluoride membrane, stained with Coomassie Brilliant Blue, and then subjected to Edman degradation using an Applied Biosystem gas-phase sequencer model 492.

### Overexpression and Purification of Recombinant CGS

DNA manipulations were conducted in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  cells and expression of recombinant proteins was performed in the *E. coli* strain BL21 CodonPlus (DE3) RIL (Stratagene). The pET29-MCGS plasmid coding the mature (without its chloroplastic transit peptide) CGS from Arabidopsis (Ravel et al., 1998) was used as a template to amplify MCGS and CCGS coding sequences for subcloning into the pET20b(+) expression vector (Novagen, Merck Biosciences). PCR was performed using the high fidelity *Pfu* DNA polymerase and primers MCGS5' (5'-ATATACATATGGTCCGCAG-3'), CCGS5' (5'-GAGACATATGAGTGACAGCTGA-CGGATTCC-3'), and CCGS3' (5'-GAGACTCGAGGATGGCTTCGAGAGCTTG-3'). The amplification products obtained with primer pairs MCGS5'/CCGS3' and CCGS5'/CCGS3' encode mature (starting with Val-69) and cleaved (starting with Ser-161) CGS, respectively. Amplicons were digested with *NdeI* and *XhoI* and cloned into the pET20b(+) vector digested by the same enzymes. The pET-MCGS-6His and pET-CCGS-6His constructs code for proteins fused with a C-terminal hexa-His tag. The DNA inserts were further sequenced to ensure that no mutation had been introduced during the course of the PCR amplification (Genome Express). *E. coli* BL21 CodonPlus (DE3) RIL cells transformed with pET-MCGS-6His or pET-CCGS-6His were grown at  $37^\circ\text{C}$  in Luria-Bertani medium supplemented with carbenicillin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). When  $A_{600}$  reached 0.6,  $0.4 \text{ mM}$  isopropylthio- $\beta$ -galactoside was added and growth continued for 16 h at  $20^\circ\text{C}$  or  $28^\circ\text{C}$  for cells transformed with pET-MCGS-6His or pET-CCGS-6His, respectively. Cells were collected by centrifugation, resuspended in buffer A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 8.0,  $0.3 \text{ M NaCl}$ ) containing 10 mM imidazole and an EDTA-free complete protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science), and disrupted by sonication. The soluble protein extract was applied onto a nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column (Qiagen) previously equilibrated with buffer A containing 10 mM imidazole. After

successive washes with buffer A supplemented with 10, 30, and 50 mM imidazole, the recombinant protein was eluted with buffer A containing 250 mM imidazole. Fractions containing CGS were pooled, dialyzed against HEPES-K 20 mM, pH 7.5, 10% (v/v) glycerol for 2 h at 4°C, and concentrated by centrifugation (Microsep, 30 kD cutoff, Pall Filtron).

## Measurements of Metabolites

Determination of folates was done by LC-MS/MS as described by Zhang et al. (2005). Following extraction, folylpolyglutamates were deconjugated in presence of rat serum to generate the corresponding monoglutamate derivatives. Reverse phase (RP)-HPLC was performed using a Purosphere Star RP-18 column (150 × 4.6 mm, 5 μm particle size, Merck) and elution of folates was done using a gradient of acetonitrile in 0.1% (v/v) formic acid (1 mL min<sup>-1</sup>, 35°C). Folates and MTX were detected by electrospray ionization on an Applied Biosystems API4000 tandem quadrupole mass spectrometer.

Extraction of soluble amino acids was performed as described by Krefth et al. (2003). Amino acids were derivatized using *O*-phthalaldehyde and analyzed by RP-HPLC using an octadecyldimethylsilica column (Hypersil C18; 150 × 4.6 mm; 3 μm; Knauer GmbH) connected to an HPLC system (Agilent Technologies 1100 series). Amino acids were eluted with a linear gradient of methanol in 50 mM sodium acetate, pH 5.7, at 0.8 mL min<sup>-1</sup> and 37°C, and detected by fluorescence (excitation 340 nm, emission 455 nm).

Thiols were extracted and derivatized with monobromobimane using the procedure described by Krefth et al. (2003). Derivatized thiols were subjected to RP-HPLC using an Atlantis dC<sub>18</sub> column (250 × 4.6 mm; 5 μm; Waters) connected to an HPLC system. Elution was done using an acetonitrile gradient in 57 mM sodium perchlorate, 0.25% (v/v) acetic acid, pH 3.4, at 1 mL min<sup>-1</sup> and 25°C. Derivatized thiols were detected by fluorescence (excitation 388 nm, emission 480 nm).

The procedure used for AdoMet and AdoHcy measurements has been adapted from Castro et al. (2002). Metabolites were derivatized with chloroacetaldehyde and separated by RP-HPLC using a Nucleodur C18 Pyramid column (250 × 4 mm, 5 μm, Macherey-Nagel) connected to an HPLC system. Elution was performed at 1 mL min<sup>-1</sup> and 25°C with a linear gradient of acetonitrile in 50 mM sodium phosphate, pH 4.5. 1,N<sup>6</sup>-etheno derivatives of AdoMet and AdoHcy were detected by fluorescence (excitation 270 nm, emission 410 nm).

## CGS Activity Measurements

CGS activity in cell extracts was assayed as described by Ravanel et al. (1995) using the *O*-phthalaldehyde derivatization procedure to measure the production of cystathionine. Prior to kinetic analysis, cellular soluble proteins (see above for extraction) were desalted on Sephadex G-25 (Nap-5 columns, GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Tricine-K, pH 7.5, and 10% (v/v) glycerol. The assay mixture (100 μL) contained 50 mM Tricine-K, pH 7.5, 0.1 mM dithiothreitol, 0.1 to 1 mM Cys, 0.1 to 10 mM OPH, 20 μM pyridoxal 5'-P, and 100 μM aminoethoxyvinyl Gly (an inhibitor of cystathionine β-lyase used to avoid cystathionine consumption by this enzyme). The ability of purified recombinant CGSs to catalyze cystathionine production was assayed either by the *O*-phthalaldehyde-derivatization procedure or by coupling CGS, cystathionine β-lyase, and lactate dehydrogenase activities using the procedure described by Curien et al. (2003). Assays were conducted at 30°C.

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under accession number ATU83500.

## Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** Respiration rates in control and MTXS-treated *Arabidopsis* cells.

**Supplemental Figure S2.** Biochemical analysis of CGS processing by a protein extract from folate-deficient *Arabidopsis* cells.

**Supplemental Figure S3.** Analysis of CGS in *Arabidopsis* cells exposed to different stresses.

## ACKNOWLEDGMENTS

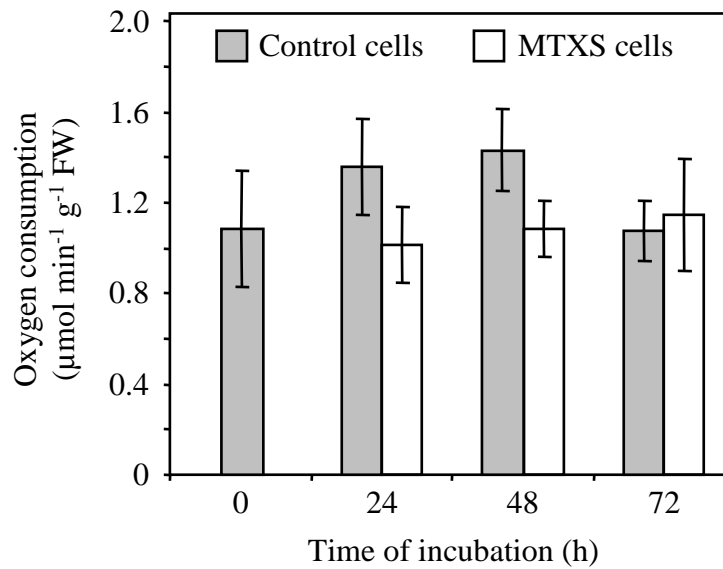
We thank Dr. Jean-Pierre Andrieu (laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Institut de Biologie Structurale, Grenoble) for performing amino acid sequence analyses. We are grateful to Drs. Claude Alban, Renaud Dumas, Eric Maréchal, and Michel Matringe (laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Grenoble) for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

Received July 12, 2007; accepted August 20, 2007; published August 24, 2007.

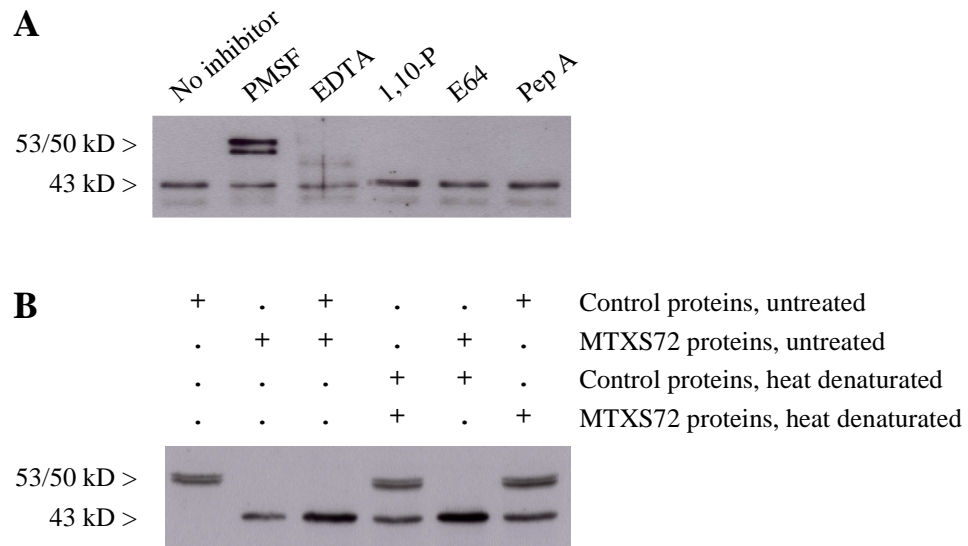
## LITERATURE CITED

- Adam Z, Rudella A, van Wijk KJ (2006) Recent advances in the study of Clp, FtsH and other proteases located in chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol* 9: 234–240
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254
- Castro R, Struys EA, Jansen EEW, Blom HJ, de Almeida IT, Jakobs C (2002) Quantification of plasma S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine as their fluorescent 1,N<sup>6</sup>-etheno derivatives: an adaptation of previously described methodology. *J Pharm Biomed Anal* 29: 963–968
- Chiba Y, Ishikawa M, Kijima F, Tyson RH, Kim J, Yamamoto A, Nambara E, Leustek T, Wallsgrave RM, Naito S (1999) Evidence for autoregulation of cystathionine gamma-synthase mRNA stability in *Arabidopsis*. *Science* 286: 1371–1374
- Chiba Y, Sakurai R, Yoshino M, Ominato K, Ishikawa M, Onouchi H, Naito S (2003) S-adenosyl-L-methionine is an effector in the posttranscriptional autoregulation of the cystathionine gamma-synthase gene in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10225–10230
- Curien G, Job D, Douce R, Dumas R (1998) Allosteric activation of *Arabidopsis* threonine synthase by S-adenosylmethionine. *Biochemistry* 37: 13212–13221
- Curien G, Laurencin M, Robert-Genthon M, Dumas R (2007) Allosteric monofunctional aspartate kinases from *Arabidopsis*. *FEBS J* 274: 164–176
- Curien G, Ravanel S, Dumas R (2003) A kinetic model of the branch-point between the methionine and threonine biosynthesis pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Eur J Biochem* 270: 4615–4627
- De Brouwer V, Zhang G-F, Storozhenko S, Van Der Straeten D, Lambert WE (May 29, 2007) pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. *Phytochem Anal* 10.1002/pca.1006
- Goto DB, Onouchi H, Naito S (2005) Dynamics of methionine biosynthesis. *Plant Biotechnol* 22: 379–388
- Goyer A, Collakova E, Shachar-Hill Y, Hanson AD (2007) Functional characterization of a methionine gamma-lyase in *Arabidopsis* and its implication in an alternative to the reverse trans-sulfuration pathway. *Plant Cell Physiol* 48: 232–242
- Hacham Y, Avraham T, Amir R (2002) The N-terminal region of *Arabidopsis* cystathionine γ-synthase plays an important regulatory role in methionine metabolism. *Plant Physiol* 128: 454–462
- Hacham Y, Schuster G, Amir R (2006) An in vivo internal deletion in the N-terminus region of *Arabidopsis* cystathionine gamma-synthase results in CGS expression that is insensitive to methionine. *Plant J* 45: 955–967
- Hanson AD, Roje S (2001) One-carbon metabolism in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 119–137
- Jabrin S, Ravanel S, Gambonnet B, Douce R, Rébeillé F (2003) One-carbon metabolism in plants: regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiol* 131: 1431–1439
- Kim JK, Bamba T, Harada K, Fukusaki E, Kobayashi A (2007) Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *J Exp Bot* 58: 415–424
- Krefth O, Hoefgen R, Hesse H (2003) Functional analysis of cystathionine γ-synthase in genetically engineered potato plants. *Plant Physiol* 131: 1843–1854
- Miles EW, Kraus JP (2004) Cystathionine beta-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J Biol Chem* 279: 29871–29874
- Moffatt BA, Weretilnyk EA (2001) Sustaining S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiol Plant* 113: 435–442

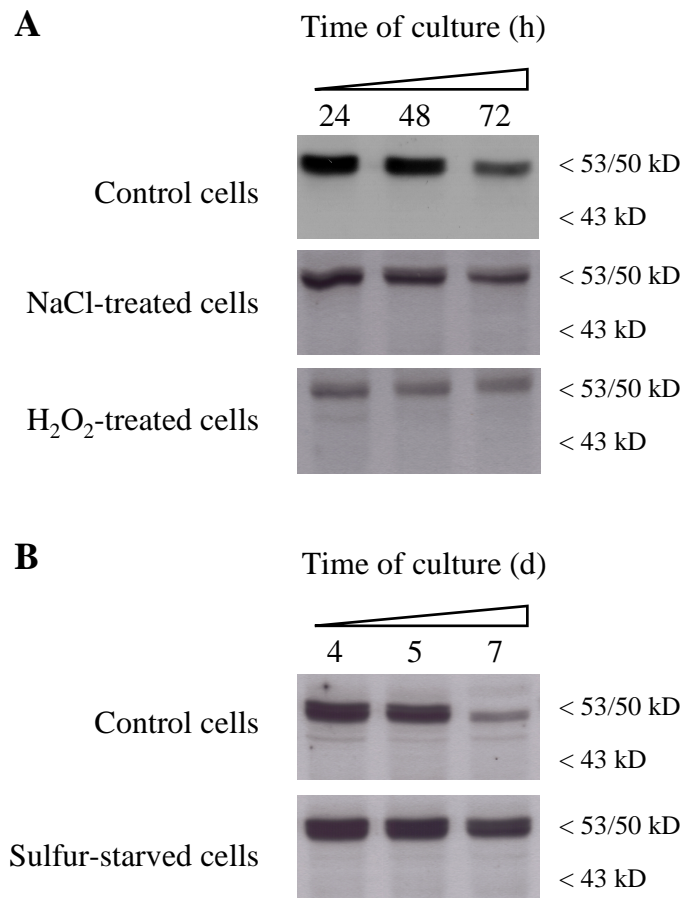
- Mouillon JM, Aubert S, Bourguignon J, Gout E, Douce R, Rébeillé F** (1999) Glycine and serine catabolism in non-photosynthetic higher plant cells: their role in C1 metabolism. *Plant J* **20**: 197–205
- Nikiforova VJ, Kopka J, Tolstikov V, Fiehn O, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hesse H, Hoefgen R** (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulfur deprivation, as revealed by metabolome analysis of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* **138**: 304–318
- Onouchi H, Nagami Y, Haraguchi Y, Nakamoto M, Nishimura Y, Sakurai R, Nagao N, Kawasaki D, Kadokura Y, Naito S** (2005) Nascent peptide-mediated translation elongation arrest coupled with mRNA degradation in the CGS1 gene of *Arabidopsis*. *Genes Dev* **19**: 1799–1810
- Orsomando G, Bozzo GG, de la Garza RD, Basset GJ, Quinlivan EP, Naponelli V, Rébeillé F, Ravanel S, Gregory JF III, Hanson AD** (2006) Evidence for folate-salvage reactions in plants. *Plant J* **46**: 426–435
- Prabhu V, Chatson KB, Lui H, Abrams GD, King J** (1998) Effects of sulfanilamide and methotrexate on  $^{13}\text{C}$  fluxes through the glycine decarboxylase/serine hydroxymethyltransferase enzyme system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **116**: 137–144
- Ranocha P, McNeil SD, Ziemak MJ, Li C, Tarczynski MC, Hanson AD** (2001) The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity. *Plant J* **25**: 575–584
- Ravanel S, Block MA, Rippert P, Jabrin S, Curien G, Rébeillé F, Douce R** (2004a) Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for *de novo* methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J Biol Chem* **279**: 22548–22557
- Ravanel S, Douce R, Rébeillé F** (2004b) The uniqueness of tetrahydrofolate synthesis and one-carbon metabolism in plants. In DA Day, AH Millar, J Whelan, eds, *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Plant Mitochondria, from Genome to Function, Vol 17. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 277–292
- Ravanel S, Droux M, Douce R** (1995) Methionine biosynthesis in higher plants. I. Purification and characterization of cystathionine gamma-synthase from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **316**: 572–584
- Ravanel S, Gakiere B, Job D, Douce R** (1998) Cystathionine gamma-synthase from *Arabidopsis thaliana*: purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem J* **331**: 639–648
- Ravanel S, Job D, Douce R** (1996) Purification and properties of cystathionine beta-lyase from *Arabidopsis thaliana* overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem J* **320**: 383–392
- Rébeillé F, Jabrin S, Bligny R, Loizeau K, Gambonnet B, Van Wilder V, Douce R, Ravanel S** (2006) Methionine catabolism in *Arabidopsis* cells is initiated by a gamma-cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 15687–15692
- Selhub J, Savin MA, Sakami W, Flavin M** (1971) Synchronization of converging metabolic pathways: activation of the Cystathionine gamma-synthase of *Neurospora crassa* by methyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 312–314
- Steegborn C, Messerschmidt A, Laber B, Streber W, Huber R, Clausen T** (1999) The crystal structure of cystathionine gamma-synthase from *Nicotiana tabacum* reveals its substrate and reaction specificity. *J Mol Biol* **290**: 983–996
- Sweetlove LJ, Heazlewood JL, Herald V, Holtzapffel R, Day DA, Leaver CJ, Millar AH** (2002) The impact of oxidative stress on *Arabidopsis* mitochondria. *Plant J* **32**: 891–904
- Wu K, Atkinson IJ, Cossins EA, King J** (1993) Methotrexate resistance in *Datura innoxia* (uptake and metabolism of methotrexate in wild-type and resistant cell lines). *Plant Physiol* **101**: 477–483
- Zhang GF, Storozhenko S, Van Der Straeten D, Lambert WE** (2005) Investigation of the extraction behavior of the main monoglutamate folates from spinach by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1078**: 59–66



**Figure S1. Respiration rates in control and MTXS-treated Arabidopsis cells.** Cells were collected at different time intervals, washed with fresh culture medium without antifolates, weighted, and introduced into an oxygen electrode containing 1 mL of culture medium without antifolates. Respiration rates measured in the dark for control (grey bars) and MTX-treated (white bars) cells are means  $\pm$  SD of four biological replicates.



**Figure S2. Biochemical analysis of CGS processing by a protein extract from folate-deficient Arabidopsis cells.** **A** - Effect of protease inhibitors on CGS processing. Soluble proteins (2.5  $\mu$ g) prepared from Arabidopsis cells treated with MTXS for 72h (MTXS72 extract) were incubated for 15 min at 25°C with either 5 mM PMSF, 20 mM EDTA, 5 mM 1,10-phenanthroline (1,10-P), 50  $\mu$ M E64, or 10  $\mu$ M pepstatin A (Pep A). Recombinant MCGS (50 ng) was then added and incubation was continued for 30 min at 25°C. MCGS processing was analyzed by western blot. **B** - Effect of heat denaturation on CGS processing. Proteins from MTXS72 or control cells were heated at 100°C for 5 min and cooled on ice. Heat denatured or untreated samples were mixed (30  $\mu$ g of each extract), incubated for 30 min at 25°C, and analyzed by western blot using antibodies against CGS.



**Figure S3. Analysis of CGS in Arabidopsis cells exposed to different stresses.** **A** - Three-day-old cell cultures were supplied with 100 mM NaCl or 44 mM hydrogen peroxide to induced salt and oxidative stresses, respectively. Cells were sampled periodically up to 72 hours; soluble proteins were extracted and analyzed by western blot using antibodies against CGS. **B** - One-week-old cells were subcloned in medium with limiting sulfur (73  $\mu$ M instead of 1.7 mM in standard conditions, see Materials and Methods) to induce sulfur starvation. Cells were collected after 4, 5, and 7 days of treatment and CGS was analyzed by western blot.

## **CHAPITRE IV**

---

**Caractérisation fonctionnelle d'un gène potentiellement impliqué dans la régulation du métabolisme monocarboné.**





## Chapitre IV

## Caractérisation fonctionnelle d'un gène potentiellement impliqué dans la régulation du métabolisme monocarboné

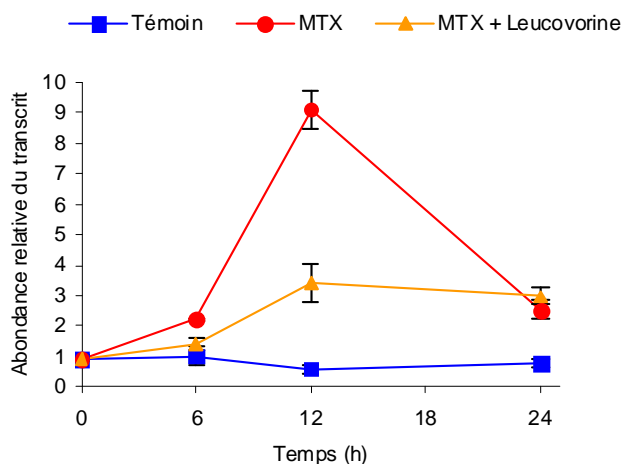
### A- INTRODUCTION.

Le but de l'étude du transcriptome d'*Arabidopsis* en situation de déficit en folates était d'acquérir de nouvelles connaissances concernant la régulation du métabolisme C1 en fonction du statut cellulaire en folates. L'analyse des données issues des puces à ADN, accompagnée de dosages métaboliques, montre qu'en réponse à une diminution du pool de folates, les cellules d'*Arabidopsis* réorientent le flux d'unités C1 vers le métabolisme des nucléotides au détriment des réactions de méthylation. Cette étude a également permis de mettre en évidence un gène qui pourrait s'avérer être un régulateur clé du métabolisme C1. L'étude de ce gène n'a été engagée que récemment, les résultats présentés dans ce chapitre sont donc préliminaires.

### I- Le gène *MIG1* (MTX-Induced Gene 1).

Le THF étant à la base d'un très grand nombre de réactions essentielles au métabolisme de la cellule végétale, l'induction d'un fort déficit en folates (jusqu'à 77 % après 24 heures de traitement) entraîne d'importantes perturbations du fonctionnement cellulaire. En conséquence, les cascades de régulation qui se mettent en place afin de répondre à cette perturbation touchent probablement, à terme, la majorité des voies métaboliques de la cellule. Dans le but d'étudier les mécanismes de réponse propres à la carence en folates et non au stress généralisé qui finit par s'établir dans la cellule, les gènes présentant une expression différentielle précoce suite au traitement (6 à 12 heures après addition du MTX) ont été examinés plus en détail. Ainsi, 677 gènes présentent une régulation transcriptionnelle précoce transitoire et 448 présentent une réponse précoce qui persiste dans le temps.

L'étude présentée ici concerne un gène présentant une induction précoce transitoire importante puisqu'il est surexprimé environ 10 fois dans les cellules traitées au MTX par rapport aux cellules témoins (Figure 1). Nous avons nommé ce gène *MIG1* (MTX-Induced Gene 1) ; son identifiant dans les bases de données est At4g24380.



**Figure 1: Profil d'expression du gène *MIG1*.**

Des cellules d'*Arabidopsis* sont traitées au MTX seul ou au MTX + Leucovorine puis récoltées à 0, 6, 12 et 24 h. Les ARNm de chaque lot de cellules sont extraits puis rétrotranscrits. L'abondance relative de chaque transcrit est ensuite déterminée par PCR quantitative en utilisant le gène de l'actine 2/7 (At5g09810) pour normaliser les données. Les mesures ont été réalisées sur 3 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques.

Lors du traitement au MTX, plusieurs gènes impliqués dans des processus de détoxication de composés xénobiotiques présentent une induction de leur expression (cf chapitre I). Afin d'exclure l'implication de *MIG1* dans ces processus, le profil d'expression du gène a été établie par PCR quantitative en temps réel sur des cellules d'*Arabidopsis* traitées au MTX et supplémentées par de la leucovorine, un dérivé stable du folate (5-CHO-THF). Il faut cependant noter que si l'addition de leucovorine dans le milieu de culture permet de rétablir, dans les cellules traitées au MTX, une teneur en folates équivalente à celle de cellules témoins, il persiste néanmoins un déséquilibre entre les différents dérivés de THF (cf chapitre I, Figure 4 et supplementary table S1 de l'article Loizeau et al, 2008). Ainsi, il apparaît que la surexpression de *MIG1* est, pour une grande part, une conséquence de la carence en folates et non d'un effet secondaire du MTX employé pour le traitement (Figure 1). Le fait que la supplémentation par la leucovorine ne permette pas de recouvrer un profil d'expression témoin peut être attribué au déséquilibre persistant entre les dérivés du cofacteur vitaminique.

Le site web TAIR (The Arabidopsis Information Resource) attribue une annotation fonctionnelle aux gènes en utilisant un vocabulaire contrôlé baptisé "Gene Ontology". De façon intéressante *MIG1* y est annoté comme participant à la biosynthèse du folate (Figure 2). Cette annotation a pour origine une homologie de séquences (30 % d'identité et 56 % de similarité) entre le produit du gène *MIG1* et la dihydrofolate réductase prédite de la levure *Schizosaccharomyces pombe* (DFR1). Chez les plantes, la dihydrofolate réductase (DHFR) est la 9<sup>ème</sup> enzyme de la voie de biosynthèse du THF, elle catalyse la réduction du dihydrofolate en THF (cf synthèse bibliographique § B-I-2). Or, si la séquence prédite de la protéine *MIG1* compte 234 acides aminés, celle de la DFR1 de *S. pombe* est deux fois plus longue (461 acides aminés). Un alignement des séquences prédites des deux protéines montre que *MIG1* s'aligne avec l'extrémité N-terminale de la DFR1 qui correspond à un domaine nommé FSH1 (Figure 3). Le nom de ce domaine tient son origine de la protéine FSH1 de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. FSH signifie "Family of Serine-Hydrolase". Les sérine-hydrolases appartiennent elles-mêmes à la super famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases.

Annotations	Category	Relationship Type	Keyword
	GO Biological Process	related to	10-formyltetrahydrofolate biosynthetic process, folic acid and derivative biosynthetic process
AGI-TIGR's comment	dihydrofolate reductase - Schizosaccharomyces pombe,PID:e1320950;supported by full-length cDNA: Ceres:27155.		2002-05-03

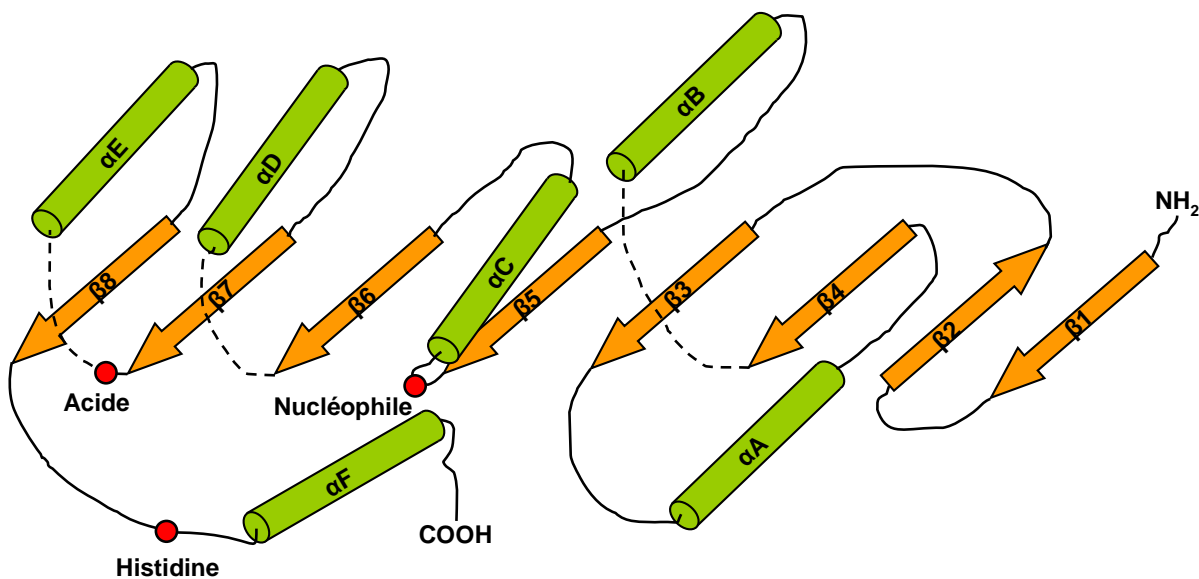
**Figure 2:** Annotations concernant le gène *MIG1* disponibles sur le site TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>).



**Figure 3:** Représentation schématique des domaines composant les protéines *MIG1* et *DFR1*. Ces différents domaines ont été identifiés par l'utilisation de l'application Pfam ([pfam.sanger.ac.uk/](http://pfam.sanger.ac.uk/)).

## II- La superfamille des $\alpha/\beta$ hydrolases.

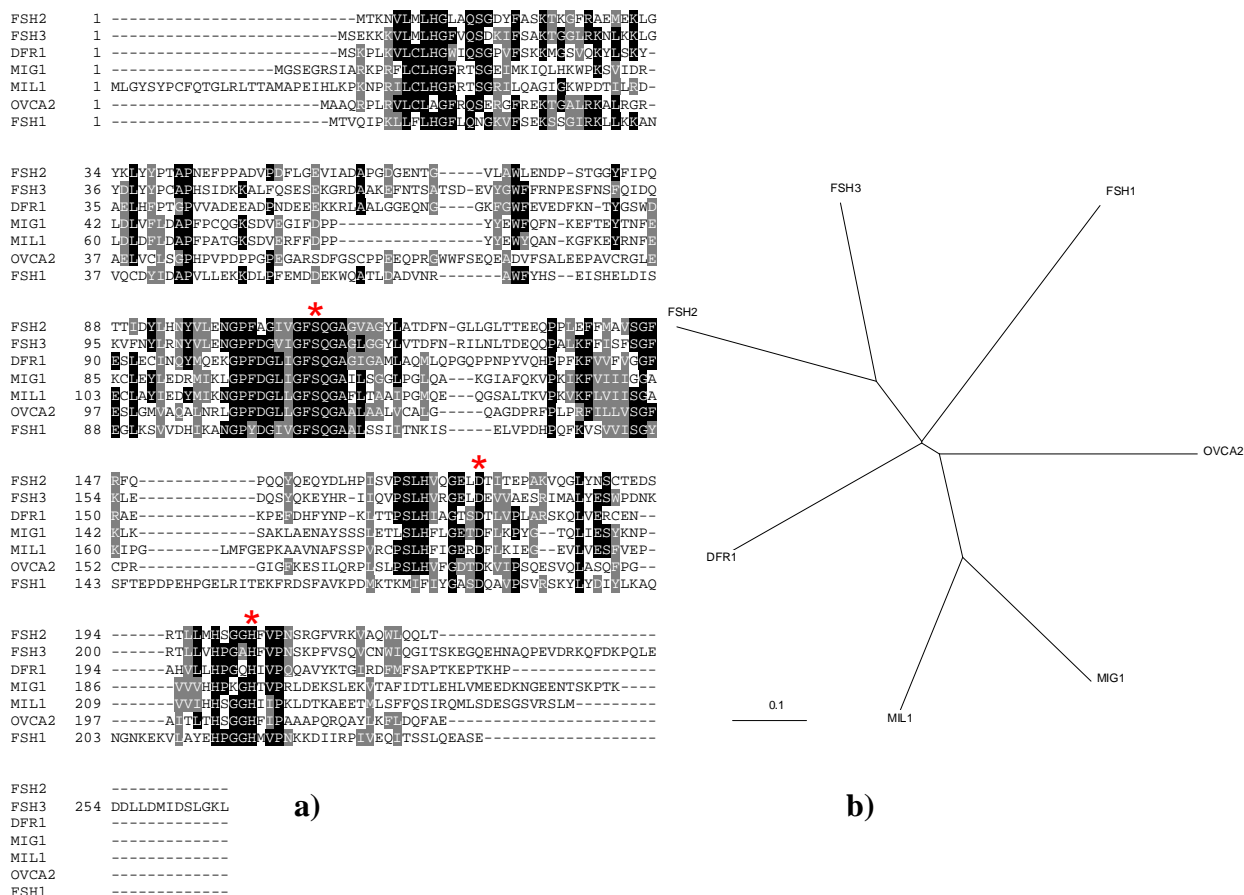
Les  $\alpha/\beta$  hydrolases possèdent des activités catalytiques diverses mais ont toutes en commun un repliement identique (Nardini et Dijkstra, 1999). Les membres de cette famille présentent des activités acétylcholine estérase, lipase, thioestérase, carboxypeptidase, oligopeptidase, déhalogénase, halopéroxydase et d'autres encore (Holmquist, 2000). Le repliement des  $\alpha/\beta$  hydrolases est très conservé. Il est constitué de 8 feuillets  $\beta$  (7 feuillets parallèles et 1 antiparallèle) et de 6 hélices  $\alpha$  (Figure 4). Si ce repliement est typique, on retrouve cependant chez de nombreuses enzymes de cette famille des insertions, au niveau des boucles de la séquence protéique, qui vont donner à la protéine une forme différente et permettre ainsi une diversité de substrats et de réactions catalysées par ces hydrolases. La masse moléculaire des  $\alpha/\beta$  hydrolases varie entre 25 et 65 kDa. Ces protéines ne semblent pas requérir de cofacteur pour leur fonction (Holmquist, 2000). Une autre particularité des protéines de cette famille est qu'elles présentent toutes une triade catalytique extrêmement bien conservée au cours de l'évolution. Cette triade est constituée d'un acide aminé nucléophile, d'une histidine et d'un acide aminé acide. Le résidu catalytique nucléophile peut être une sérine, une cystéine ou un aspartate. Le résidu acide est un aspartate ou un glutamate. Seule l'histidine ne varie pas. La disposition dans l'espace de ces trois résidus est remarquablement conservée au sein de cette famille protéique (Nardini et Dijkstra, 1999).



**Figure 4:** Structure secondaire schématique du repliement typique d'une  $\alpha/\beta$  hydrolase. Les hélices  $\alpha$  sont représentées en vert et les feuillets  $\beta$  en orange. Les positions des acides aminés de la triade catalytique sont indiquées par des pastilles rouges. D'après Holmquist (2000).

### III- La famille des sérine-hydrolases.

Les protéines de cette famille partagent une forte homologie de séquence, environ 30 % d'identité et 50 % de similarité (Figure 5). Ces sérine-hydrolases sont très largement représentées chez les eucaryotes mais on ne retrouve aucun membre de cette famille chez les organismes procaryotes. Sur la base d'alignements de séquences protéiques, on estime à plus de 150 le nombre de protéines appartenant à cette famille. La structure d'une sérine-hydrolase de *S. cerevisiae* a été résolue (Quevillon-Cheruel et al, 2005). Cette protéine, FSH1, présente le repliement typique d'une  $\alpha/\beta$  hydrolase bien que 2 des 8 feuillets  $\beta$  soient absents de sa structure (cette caractéristique est partagée par beaucoup d'autres hydrolases de cette superfamille). Les résidus composant la triade catalytique sont regroupés au niveau d'une poche constituant le site actif de la protéine FSH1 (Figure 6). Le serveur de modélisation SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) nous a permis de prédire la structure tridimensionnelle de MIG1 qui semble présenter de nombreuses ressemblances avec celle de FSH1, notamment concernant la position des résidus de la triade catalytique (Figure 6)

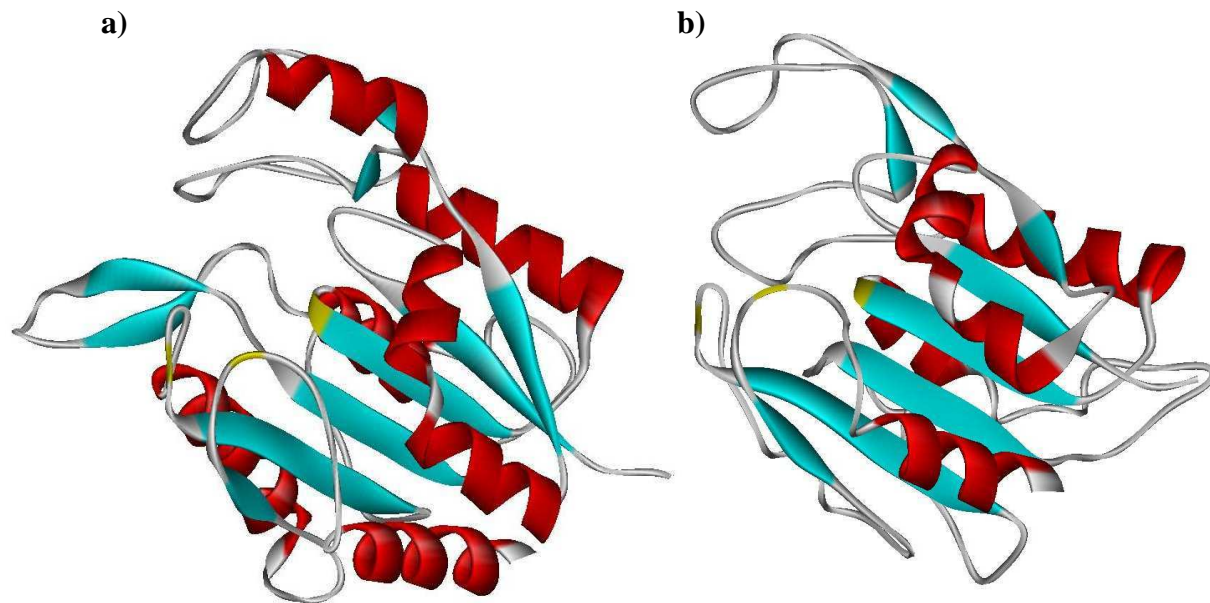


**Figure 5:** a) Alignement des séquences de différentes protéines appartenant à la famille des sérine-hydrolases.

Les séquences ont été alignées en utilisant la méthode ClustalW, selon la matrice Blossum 62. Les résidus de la triade catalytique sont marqués par des astérisques rouges.

**b) Arbre phylogénétique représentant les distances entre les sérine-hydrolases utilisées pour l'alignement.**

La longueur des branches entre les protéines est exprimée en nombre de substitutions de résidu par site. Cet arbre a été généré par le logiciel Treeview à partir de l'alignement de séquence ClustalW.



**Figure 6:** a) Structure de la protéine FSH1 et b) Structure prédite de la protéine MIG1.

La structure de FSH1 a été résolue (Quevillon-Cheruel et al, 2005) alors que celle de MIG1 a été modélisée grâce à l'utilisation du serveur SWISS-MODEL. Les hélices  $\alpha$ , les feuillets  $\beta$  et les boucles sont représentés respectivement en rouge, bleu et gris. Les acides aminés de la triade catalytique sont colorés en jaune.

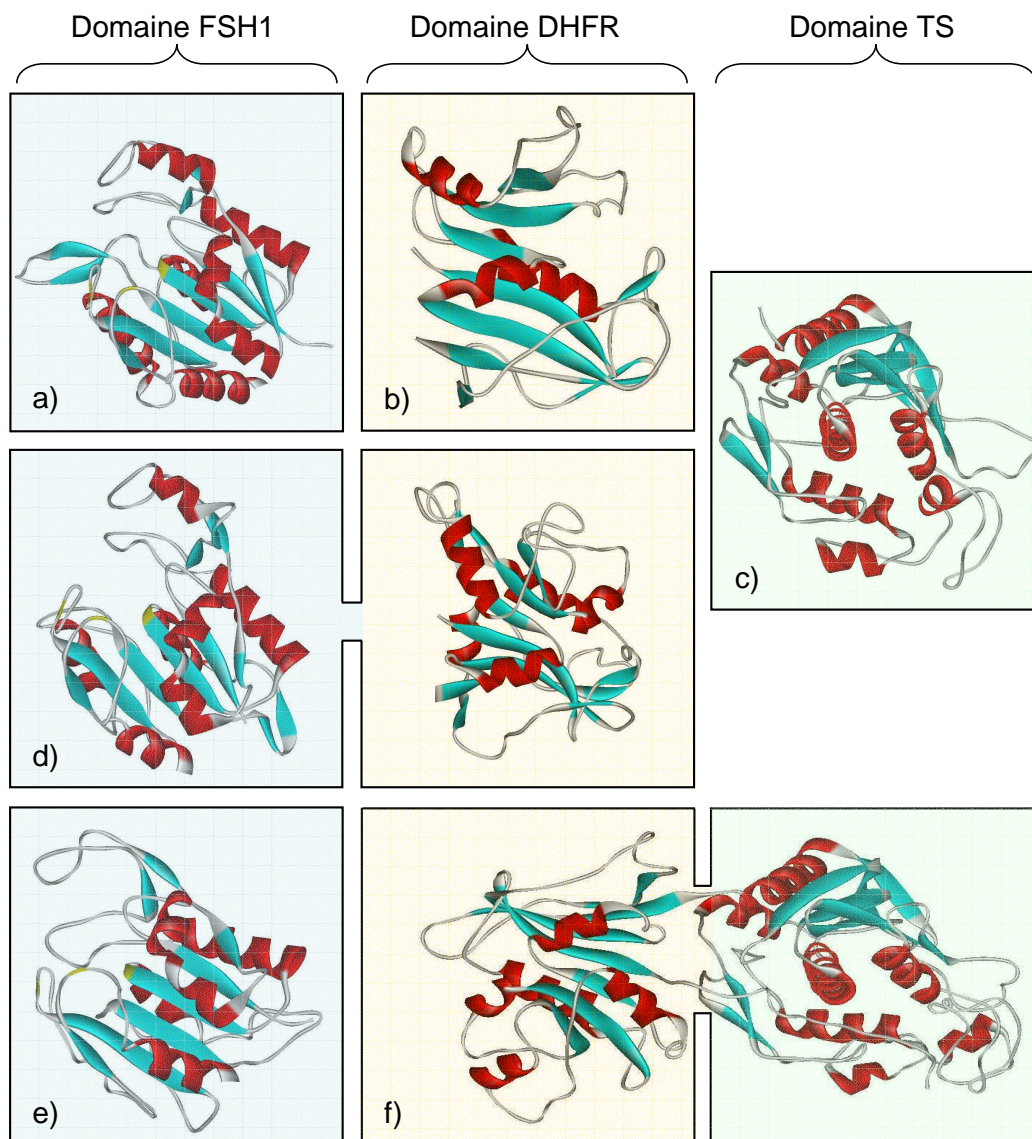
A ce jour, on ne connaît la fonction d'aucune de ces sérine-hydrolases. Cependant, la littérature fait mention de deux de ces protéines, OVCA2 et FSH3 (Figure 5), et les relie respectivement au processus de tumorigénèse et au métabolisme des nucléotides.

La protéine humaine OVCA2 (OVary Cancer 2) est codée par un gène suppresseur de tumeur (Schultz et al, 1996). En effet, l'équipe d'Andrew K. Godwin a pu établir une relation entre une diminution de l'expression du gène *OVCA2* et l'apparition de certains cancers (cancers des ovaires et médulloblastomes en particulier) (Prowse et al, 2002). OVCA2 possède des homologues notamment chez le rat, la souris et le bœuf. Des prédictions d'interaction protéine-protéine suggèrent que OVCA2 pourrait interagir avec certaines protéines présentant un domaine BAG (Bcl 2 associated AthanoGene) (Azizi et al, 2006). La famille des protéines à domaine BAG comporte des agents pro-apoptotiques. Ainsi, les auteurs suggèrent que l'activité sérine-hydrolase de OVCA2 pourrait lui permettre, *via* les processus d'apoptose, de jouer son rôle de suppresseur de tumeur (Azizi et al, 2006).

La sérine-hydrolase FSH3 est, quant à elle, une protéine de la levure *S. cerevisiae*. L'expression du gène *FSH3* est régulée par un facteur de transcription CRT1 (Zaim et al, 2005). Ce dernier est impliqué dans la réponse de la cellule aux dommages causés à l'ADN. Pour cela, il reconnaît une séquence d'environ 13 paires de bases au niveau du promoteur de certains gènes cibles et notamment des gènes de ribonucléotide réductases. Ces protéines, qui sont spécifiques des nucléosides diphosphates, catalysent la transformation de ribonucléotides en désoxyribonucléotides (ADP en dADP par exemple). En se basant sur l'homologie de séquence entre FSH3 et le domaine FSH1 de la DFR1, les auteurs de cet article suggèrent que le facteur de transcription CRT1 permet, en modulant l'expression des ribonucléotides réductases ainsi que celle de FSH3, de coordonner la synthèse des noyaux puriques et pyrimidiques et le métabolisme du folate (Zaim et al, 2005).

#### IV- Objectifs de l'étude.

Il apparaît que la situation rencontrée chez *S. pombe* est unique puisqu'à la connaissance générale, il n'existe pas d'autre organisme chez lequel le domaine DHFR est fusionné à un domaine FSH1 (Figure 7). De plus, la structure de la DFR1 vient s'ajouter aux deux architectures déjà connues des protéines présentant une activité DHFR. En effet, chez certains organismes, on retrouve les 3 domaines FSH1, DHFR et thymidylate synthase (TS) séparément (notamment chez l'Homme) alors chez d'autres, comme *Arabidopsis* et *Trypanosoma*, on retrouve les domaines DHFR et TS fusionnés sur une même séquence protéique. La situation semble donc relativement complexe puisqu'à partir de 3 domaines protéiques, il existe 3 combinaisons différentes (Figure 7).



**Figure 7 : Structure tridimensionnelle et organisation des domaines FSH1, DHFR et TS chez différentes espèces.**

a) FSH1 chez *S. cerevisiae*, b) DHFR chez *H. sapiens*, c) TS chez *H. sapiens*, d) DFR1 chez *S. pombe*, e) MIG1 chez *A. thaliana* et f) DHFR-TS chez *T. cruzi*.

a), b), c) et f) sont des structures protéiques résolues (Quevillon-Cheruel et al, 2005 ; Cody et al, 1997 ; Phan et al, 2001 ; Schormann et al, 2008) alors que d) et e) ont été modélisées grâce à l'utilisation du serveur SWISS-MODEL. Les hélices  $\alpha$ , les feuilletts  $\beta$  et les boucles sont représentés respectivement en rouge, bleu et gris. Les acides aminés de la triade catalytique sont colorés en jaune.

Si la fonction exacte des sérine-hydrolases reste encore inconnue, les différentes études menées sur OVCA2 et FSH3 (Schultz et al, 1996 ; Azizi et al, 2006 ; Zaim et al, 2005) tendent à indiquer que cette famille de protéines joue un rôle pour le moins important chez les eucaryotes.

La forte induction de l'expression du gène *MIG1* dans des cellules d'*Arabidopsis* en situation de déficit en folates ainsi que l'homologie de séquence que *MIG1* partage avec l'extrémité N-terminale de la *DFR1* suggèrent que cette protéine est un élément clef de la régulation du métabolisme C1. De plus, et compte tenu de la fusion sur une même séquence protéique des domaines *FSH1* et *DHFR* chez *S. pombe*, il paraît très probable que cette régulation s'exerce *via* une interaction entre *MIG1* et la *DHFR*. Dans ce contexte, plusieurs hypothèses quant à la nature exacte du rôle joué par *MIG1* peuvent être formulées :

— *MIG1* est une protéine régulatrice qui ne présente pas d'activité catalytique. En fixant un ligand, éventuellement un métabolite s'accumulant lors d'une diminution du pool de folates, *MIG1* pourrait réguler l'activité de la *DHFR* afin de favoriser la synthèse de THF (Figure 8a). Cette éventualité est d'autant plus probable que chez *S. pombe* les domaines *DHFR* et *FSH1* sont réunis sur un même polypeptide. Leur production étant co-réglée, l'intervention d'un ligand pour moduler l'effet du domaine *FSH1* sur la partie *DHFR* est donc nécessaire. Chez *Arabidopsis*, la situation est différente car ces deux domaines sont séparés. L'effet de *MIG1* sur la *DHFR* est donc moins évident puisque la probabilité d'interaction entre les deux protéines est plus faible. La surexpression de *MIG1*, comme observée lors du déficit en folates, pourrait ainsi compenser la séparation des deux domaines sur des protéines distinctes.

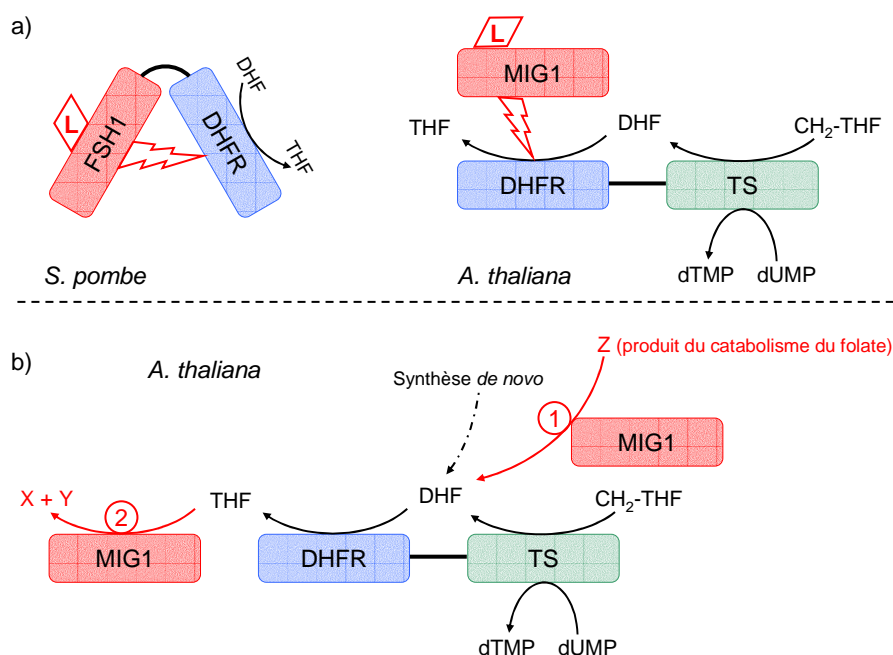
Cette hypothèse selon laquelle *MIG1* serait une protéine régulatrice n'est, cependant, pas celle que nous privilégions. En effet, au sein de la superfamille des  $\alpha / \beta$  hydrolases, on ne connaît pas de protéine ne présentant aucune activité catalytique. De plus, il est très probable que les sérine-hydrolases possèdent une activité enzymatique puisqu'elles présentent toutes (*MIG1* y compris) une triade catalytique.

— *MIG1* possède une activité enzymatique. Dans ce cas, il existe deux possibilités.

Selon la première, le produit de la réaction catalysée par *MIG1* tient lieu de substrat à la *DHFR*. Cette dernière possède une activité réductase qu'elle exerce sur le DHF pour produire du THF. Le DHF est lui-même issu de la voie de synthèse *de novo* de folate ou bien de l'activité TS. Selon la première possibilité (Figure 8b), le DHF pourrait également être produit par *MIG1* dans le cadre d'un système de recyclage du folate. En effet, Orsomando et al (2006) ont estimé à 10 % par jour la vitesse de catabolisme des folates chez des plants d'*Arabidopsis* exposés au sulfanilamide. Au cours d'un traitement au MTX, les cellules d'*Arabidopsis* présentent une vitesse de dégradation des folates jusqu'à 4 % par heure. *MIG1* pourrait donc prendre en charge un composé issu de la dégradation oxydative du folate afin de produire du DHF, lui-même réduit en THF par la *DHFR*. Une surexpression du gène *MIG1*, telle qu'observée lors de la diminution du pool de folates, permettrait alors d'accentuer le recyclage du THF.

Selon la deuxième possibilité (Figure 8b), *MIG1* pourrait utiliser le THF produit par la *DHFR* comme substrat. Or, même si l'on ne connaît pas la fonction exacte des sérine-hydrolases, la nature de la triade catalytique qui les caractérise indique que l'activité de cette famille de protéines consiste à cliver des liaisons peptidiques, ester, thioester ou des liaisons C-C ou C-O. *MIG1* a donc potentiellement pour fonction d'hydrolyser le THF. Cette possibilité semble toutefois peu probable compte tenu du fait que *MIG1* est surexprimé en condition de déficit en folates et que dans cette situation il ne présente pas grand intérêt de cliver du THF.





**Figure 8 : Représentation schématique des rôles potentiels de MIG1 dans la régulation du métabolisme C1 lors d'une carence en folates.**

a) Le domaine FSH1 de la DFR1 et la protéine MIG1, respectivement chez *S. pombe* et chez *Arabidopsis*, permettent, en liant un ligand L, de réguler l'activité DHFR.

b) MIG1 présente une activité catalytique qui permet soit d'accroître le recyclage d'un composé Z issu du catabolisme des folates (1), soit de modifier le THF par clivage (2).

Nous avons mis en place une stratégie d'étude combinant des approches *in vitro* et *in planta* afin de caractériser la fonction du gène *MIG1*. Les analyses effectuées *in vitro* incluent la protéine DFR1 de *S. pombe* qui est un modèle unique de protéine de fusion entre un domaine FSH1 et un domaine DHFR.

Cette étude pourrait nous permettre non seulement d'accéder pour la première fois à la fonction d'une sérine-hydrolase mais également de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation du métabolisme monocarboné en réponse à une diminution du pool de folates. Ce mécanisme est potentiellement partagé par de nombreux organismes eucaryotes au delà du règne végétal.

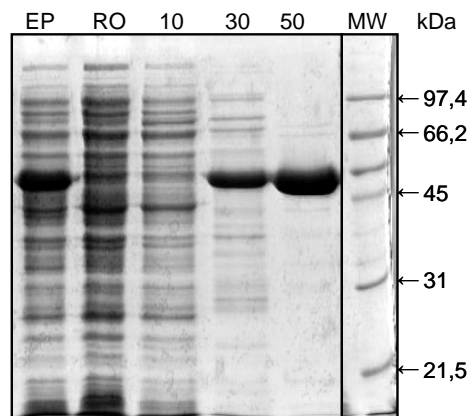
## B- ETUDES *IN VITRO* DES PROTEINES MIG1 ET DFR1.

### I- Surproduction et purification de la protéine DFR1 de *S. pombe*.

Le clonage de la séquence codant la DFR1 dans le vecteur pET20b(+) permet de fusionner une étiquette 6-histidines en C-terminal de la séquence protéique. La protéine ainsi marquée est ensuite purifiée sur une résine Ni-NTA (Figure 9).

La DFR1 (51,5 kDa) éluée à 50 mM d'imidazole présente une pureté suffisante pour la réalisation de tests d'activité enzymatique. Au préalable, cette fraction a été dessalée ce qui permet éliminer les fortes concentrations d'imidazole et de NaCl qui pourraient interférer

avec l'activité de l'enzyme. Le rendement atteint pour cette purification est de 16 % (33 mg de DFR1 pure à partir de 205 mg d'extrait protéique soluble).

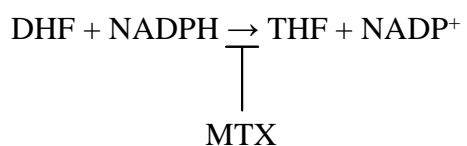


**Figure 9 : Profil de purification de la DFR1 de *S. pombe* sur résine Ni-NTA.**

L'extrait protéique soluble (EP) a été préparé à partir de bactéries Rosetta 2 transformées par la construction pET20-DFR1-6His et collectées en phase stationnaire. Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie. RO : run-off ; les pistes 10, 30 et 50 correspondent respectivement aux éluitions des protéines par un tampon [50 mM KPi ; 500 mM NaCl ; pH 8,0] additionné de respectivement 10, 30 et 50 mM d'imidazole.

## II- Mesure de l'activité dihydrofolate réductase de la protéine DFR1 de *S. pombe*.

L'activité DHFR de la protéine DFR1 de *S. pombe* n'était, jusqu'à présent, que prédite sur la base d'alignements de séquences (Bertani et Campbell, 1994). La réalisation d'un test enzymatique basé sur la mesure de l'oxydation du NADPH lors de la réduction du DHF en THF ainsi que l'ajout de MTX (Figure 10) (Neuburger et al, 1996) ont permis de valider l'activité DHFR de la DFR1.



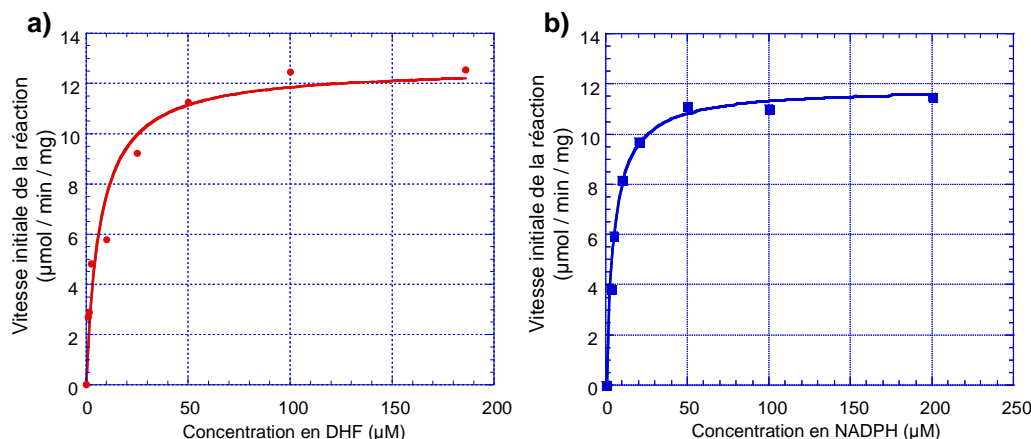
**Figure 10: Réaction catalysée par la DHFR.**

Le DHF est réduit en THF en utilisant le pouvoir réducteur du NADPH qui est alors oxydé en NADP<sup>+</sup>. Le MTX est un inhibiteur spécifique de la DHFR.

Les mesures de Vmax et de Km (Figure 11) ont été réalisées telles qu'indiquées dans la partie "Matériels et méthodes" :

- Vmax : 12,2 μmol / min / mg de protéine
- Km<sub>NADPH</sub> : 4,8 ± 0,3 μM
- Km<sub>DHF</sub> : 6,7 ± 1,8 μM

Ces valeurs sont de l'ordre de celles trouvées dans la littérature, notamment pour la DHFR-TS de pois (Km<sub>NADPH</sub> = 28 ± 5 μM, Km<sub>DHF</sub> = 0,7 ± 0,2 μM ; Neuburger et al, 1996) ou pour les DHFR monofonctionnelles d'*E. coli* (Km<sub>NADPH</sub> = 17,8 ± 0,9 μM, Km<sub>DHF</sub> = 3,1 ± 0,1 μM ; Ohmae et al, 2008) ou de l'Homme, puisque les gammes de Km rapportées vont de 0,11 μM à 170 μM pour le Km<sub>NADPH</sub> et de 2,5 μM à 5,9 μM pour le Km<sub>DHF</sub> (Delcamp et al, 1983).

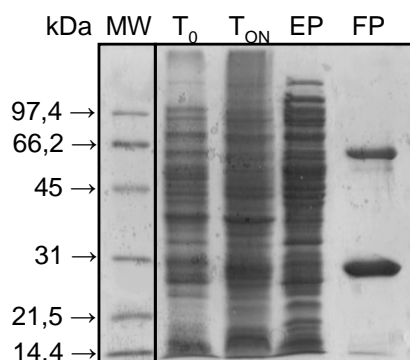


**Figure 11: Caractérisation cinétique de l'activité DHFR de la protéine DFR1 de *S. pombe*.**  
 a) Courbe de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en DHF. b) Courbe de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en NADPH.

Dans les conditions *in vitro* de ce test enzymatique, il apparaît que le domaine FSH1 de la DFR1 n'interfère pas avec le domaine DHFR. En effet, l'efficacité catalytique de l'enzyme reste comparable à celle d'une DHFR-TS ou d'une DHFR monofonctionnelle. Une des hypothèses avancées dans le paragraphe "IV-Objectifs de l'étude" de ce chapitre suggère l'intervention d'un métabolite qui permettrait au domaine FSH1 d'interagir avec le domaine DHFR pour moduler l'activité de ce dernier. L'intégration dans ce test enzymatique de différentes molécules relatives au métabolisme C1 pourrait ainsi permettre aux deux domaines d'interagir *via* un changement de conformation de la DFR1.

### III- Surproduction et purification de la protéine MIG1.

Tout comme pour la DFR1, lors du clonage de MIG1 dans pET20b(+), la séquence de la protéine a été fusionnée en C-terminal à une étiquette poly-histidine, permettant ainsi sa purification sur résine Ni-NTA. Les conditions d'expression de MIG1 en système bactérien sont atypiques. En effet, les bactéries recombinantes cultivées en milieu LB sont placées 10 minutes à 47°C avant l'induction de la synthèse de MIG1. Ce stress thermique provoque la production de protéines chaperonnes "heat shock protein" qui vont alors favoriser le bon repliement de la protéine recombinante (cf "Matériels et méthodes"). Malgré le faible niveau d'expression de MIG1 dans la fraction soluble (Figure 12), la protéine a été purifiée sur colonne de Nickel. La pureté de MIG1 est cependant relativement médiocre puisque la fraction purifiée est composée à environ 70 % de la protéine d'intérêt et à 30 % d'un contaminant dont le poids moléculaire est de 65 kDa. Le rendement de cette purification est de 0,5 % (423  $\mu\text{g}$  de fraction purifiée à partir de 75 mg d'extrait protéique soluble).



**Figure 12: Purification de la protéine MIG1 par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA.**

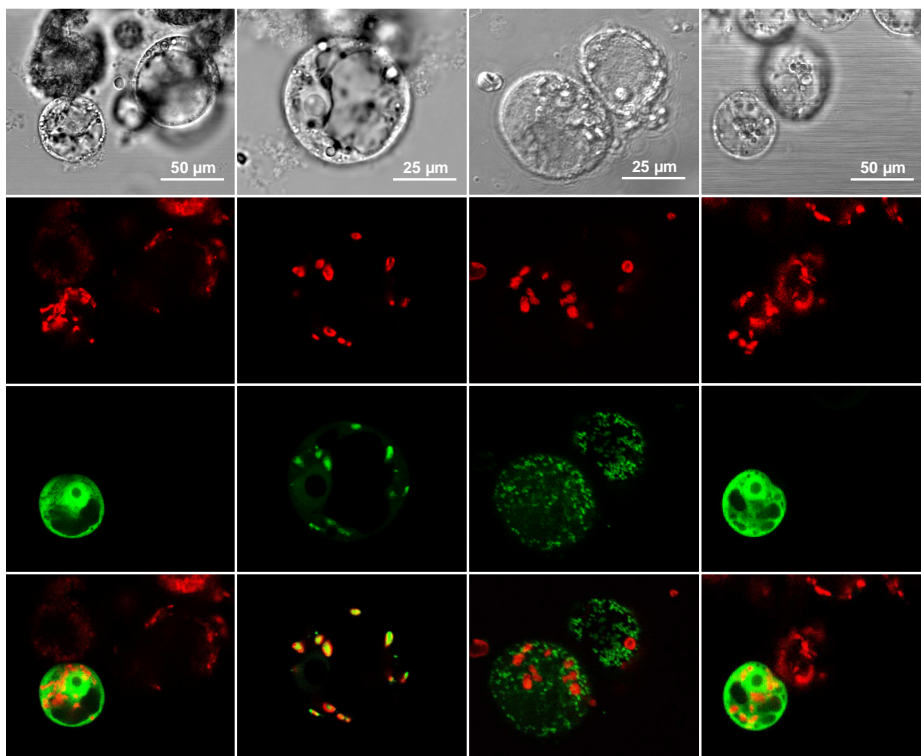
L'extrait protéique soluble (EP) a été préparé à partir de bactéries Rosetta 2 transformées par la construction pET20-MIG1-6His et collectées en phase stationnaire. Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie. T<sub>0</sub> : extrait protéique total avant induction à l'IPTG ; T<sub>ON</sub> : extrait protéique total après induction ; FP : fraction purifiée.

En dépit de sa faible pureté, cet extrait a tout de même été utilisé pour réaliser le test enzymatique décrit pour la DFR1. Ce dernier démontre que MIG1 ne présente pas d'activité DHFR, ce qui corrobore les alignements de séquences réalisés auparavant indiquant que MIG1 présente une forte homologie avec le domaine FSH1 de la DFR1 et non avec le domaine DHFR (Figure 3).

## C- ETUDES *IN PLANTA* DE LA PROTEINE MIG1.

### I- Localisation subcellulaire de la protéine MIG1.

La localisation subcellulaire de la protéine MIG1 a été déterminée par des expériences de transformation transitoire de protoplastes d'*Arabidopsis* (Figure 13). Au préalable, la séquence complète de MIG1 a été fusionnée en N-terminal de la séquence codant la GFP (Cf "Matériels et méthodes"). Les clichés suivants ont été réalisés en microscopie confocale avec l'aide de Didier Grunwald sur la plateforme de microscopie de l'iRTSV. Ils indiquent clairement que la protéine MIG1 est localisée dans le cytosol, ce qui corrobore les prédictions de localisation obtenues par l'utilisation de différents outils informatiques (Predotar, TargetP et WoLF PSORT). De plus, cette localisation cytosolique de MIG1 conforte l'hypothèse d'une interaction entre cette dernière et la DHFR-TS puisque le génome d'*Arabidopsis* code pour trois isoformes de la protéine dont une se trouve dans le cytosol. Dans le cas de figure où MIG1 n'interagirait pas avec la DHFR-TS, sa localisation permettra de restreindre la recherche de partenaires potentiels aux protéines situées dans le cytosol.



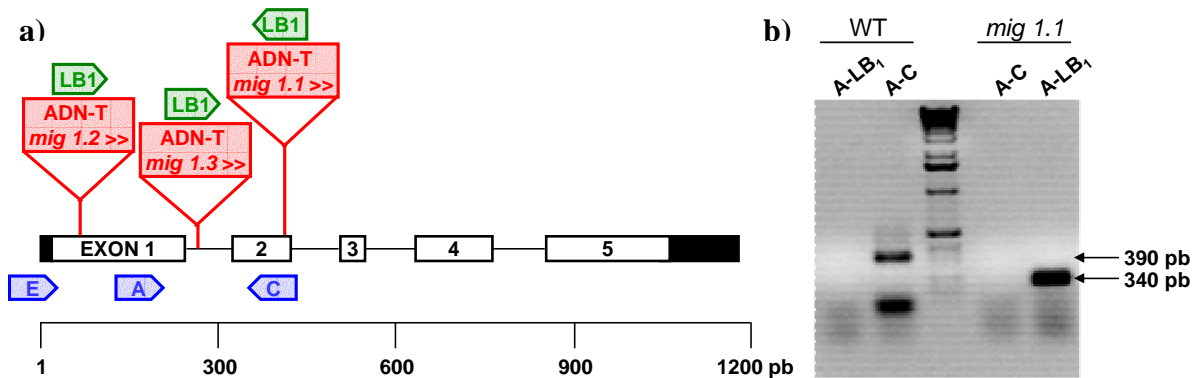
**Figure 13:** Localisation subcellulaire de MIG1 fusionnée à la GFP.

1<sup>ère</sup> ligne : observation de protoplastes en transmission. 2<sup>ème</sup> ligne : autofluorescence de la chlorophylle. 3<sup>ème</sup> ligne : fluorescence de la GFP. 4<sup>ème</sup> ligne : superposition des fluorescences de la chlorophylle et de la GFP. Les 3 premières colonnes montrent respectivement : l'expression cytosolique de la GFP seule, l'expression chloroplastique de la GFP fusionnée au peptide de transit de la petite sous-unité de la Rubisco et l'expression mitochondriale de la GFP fusionnée au peptide de transit de l'HPPK-DHPS (Ravanel et al, 2001). La quatrième colonne montre la localisation cytosolique de MIG1. La fluorescence est observée au microscope confocal.

## II- Génotypage par PCR de mutants KO *mig1*.

Plusieurs lignées de mutants knock-out (KO) pour le gène *MIG1* sont disponibles au Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL). Il s'agit de mutants par insertion d'un ADN-T (ADN de Transfert) de grande taille (environ 4,5 kb) qui interrompt le cadre de lecture du gène et supprime ainsi son expression (Alonso et al, 2003). Les lignées disponibles diffèrent par la localisation de l'insertion de l'ADN-T. En effet, le Salk Institute génère des milliers de mutants d'insertion puis établit ensuite le lieu d'insertion de l'ADN-T. Si chaque lignée présente une insertion unique au niveau du gène d'intérêt, il est important de noter que ces mêmes lignées contiennent, en moyenne, 1,5 insertion sur la totalité de leur génome (Alonso et al, 2003) (environ 50 % des lignées du Salk présentent une seule insertion dans leur génome alors que les 50 % restant contiennent deux ADN-T ou plus). L'analyse d'un mutant KO à partir de différentes lignées minimise ainsi les risques d'attribuer de façon erronée un caractère particulier à un mutant, alors qu'en réalité, ce caractère est dû à une insertion au niveau d'un locus autre que celui d'intérêt. L'étude de mutants KO pour le gène *MIG1* sera donc réalisée sur 3 lignées indépendantes : *mig 1.1*, *mig 1.2* et *mig 1.3*, présentant respectivement une insertion d'ADN-T au niveau du 2<sup>ème</sup> exon, du 1<sup>er</sup> exon et du 1<sup>er</sup> intron (Figure 14).

Les lots de graines fournis par SIGnAL sont issus de la 3<sup>ème</sup> génération (F3) après transformation par *Agrobacterium* et sont donc composés de graines homozygotes ou hétérozygotes pour l'insertion de l'ADN-T mais également de graines sauvages. L'analyse de la perte de fonction du gène *MIG1* nécessite au préalable de ségréguer par PCR les graines homozygotes pour la mutation. Les séquences des amorces utilisées pour ce génotypage sont indiquées dans la partie "Matériels et méthodes". Leur localisation sur le gène *MIG1* est représentée sur la figure 14. L'amorce LB<sub>1</sub> (Left Border), qui est spécifique de la bordure gauche de l'ADN-T, permet, quand elle est utilisée en combinaison avec l'un des primers A, B ou C, d'amplifier l'allèle muté de *MIG1* (Figure 14).



**Figure 14 :** a) Représentation schématique du gène *MIG1* et localisation de l'ADN-T et des amorces utilisées pour le génotypage.

En fonction de la lignée knock-out (*mig 1.1*, *mig 1.2* ou *mig 1.3*), l'ADN-T est inséré en différents endroits du gène. Les introns sont représentés par des traits, les exons par des rectangles blancs et les extrémités non traduites par des rectangles noirs. L'insertion de l'ADN-T ainsi que son sens (5' >> 3') sont représentés en rouge. Les amorces utilisées pour le génotypage sont indiquées par des flèches bleues ou vertes.

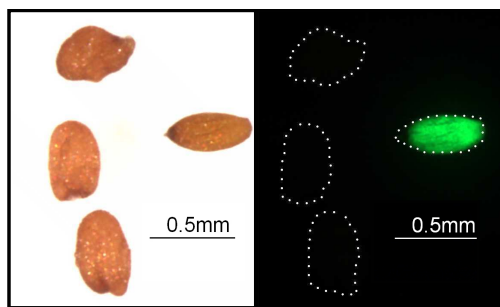
### b) Génotypage par PCR d'une plantule issue du lot de graines *mig 1.1*.

Le couple d'amorces A-C amplifie la copie sauvage (390 pb) du gène *MIG1* alors que le couple A-LB<sub>1</sub> amplifie la copie mutée (340 pb). Un contrôle positif a été réalisé sur l'ADNg d'une plantule sauvage (pistes WT).

### III- Conception et sélection de lignées *MIG1::GUS*.

La localisation tissulaire de la protéine MIG1 en situation physiologique mais également lors d'une carence en folates est susceptible de fournir de précieuses informations quant au rôle joué par cette protéine *in planta*. Pour cela, la totalité de la séquence codante de *MIG1* ainsi que sa région promotrice potentielle (environ 480 pb) sont insérées dans le plasmide pEDW5 en amont de la séquence de la  $\beta$ -glucuronidase (cf "Matériels et méthodes"). Cette construction est ensuite utilisée pour transformer des plantules sauvages d'*Arabidopsis* (écotype Columbia 8) par *Agrobacterium tumefaciens*.

Le plasmide pEDW5 porte également la séquence codante de la GFP sous la dépendance du promoteur At2S3 spécifique de la graine. Ainsi, les graines ayant intégrées la construction sont sélectionnées sur la base de la fluorescence de la GFP (Bensmihen et al, 2004) (Figure 15).



**Figure 15** : Observation à la loupe binoculaire de graines d'*Arabidopsis* issues d'une plante transformée par pEDW5-MIG1.

Image de gauche : observation des graines en lumière blanche. Image de droite : observation des mêmes graines sous UV. Seules les graines ayant intégré le plasmide pEDW5-MIG1 présentent la fluorescence verte de la GFP.

### IV- Conception et sélection de lignées surexprimant *MIG1*.

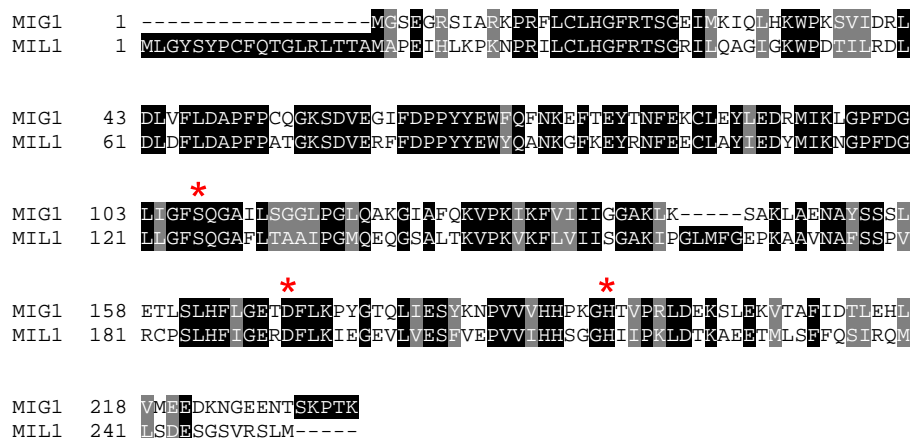
L'étude de plantules d'*Arabidopsis* surexprimant *MIG1* s'inscrit dans la caractérisation *in planta* de ce gène. Des plants sauvages (écotype Columbia 8) ont donc été transformés par *A. tumefaciens*, avec le plasmide pFP101 portant le promoteur constitutif viral 2 x 35S en amont de la séquence codant *MIG1* (cf "Matériels et méthodes") permettant ainsi une très forte expression du transgène dans tous les territoires de la plante. De la même manière que le plasmide pEDW5, pFP101 permet la sélection des graines transformées sur la base de la fluorescence de la GFP (Bensmihen et al, 2004)

L'étude de ces lignées surexprimant *MIG1* permettra de déterminer si une surexpression constitutive de ce gène constitue un avantage pour la plante notamment en lui conférant une résistance accrue à un déficit en folates.

### V- Le gène *MIL1* (MTX-Induced gene Like 1).

La base de données TAIR signale que le gène *MIG1* présente un paralogue chez *Arabidopsis* codé par le gène At5g65400. Nous avons nommé ce gène MIL1 (MTX-Induced gene Like 1) (Figure 16). Le serveur de comparaison de séquences protéiques de l'Université de Virginie (<http://fasta.bioch.virginia.edu>) évalue à respectivement 54 % et 77 % les pourcentages d'identité et de similarité entre les deux protéines. Sur la base d'alignements de séquences et de la conservation de la triade catalytique Sérine – Aspartate – Histidine, il semble que MIL1 fasse également partie de la famille de sérine-hydrolases (Figures 5 et 16).

Il est intéressant de noter que le profil d'expression de *MIL1* reste constant et similaire à celui des cellules témoins au cours de la cinétique de traitement au MTX réalisée dans le cadre de notre analyse transcriptomique globale (Chapitre I) (données non montrées). Bien qu'homologue de *MIG1*, le gène *MIL1* n'est donc pas induit au cours d'un déficit en folates. La fonction de ces deux gènes est donc vraisemblablement différente. Toutefois, l'étude de l'expression de *MIL1* dans les lignées KO et surexprimeurs pour *MIG1* sera effectuée afin de caractériser une éventuelle redondance fonctionnelle de ces deux gènes.



**Figure 16 : Alignement des séquences des protéines MIG1 et MIL1.**

Les séquences ont été alignées en utilisant la méthode ClustalW, selon la matrice Blosum 62. Les résidus de la triade catalytique sont marqués par des astérisques rouges.

## D- CONCLUSION.

Le but de cette étude est de caractériser la fonction de *MIG1* et d'établir la relation existant éventuellement entre ce gène et la régulation du métabolisme C1. Divers éléments exposés dans l'introduction de ce chapitre suggèrent que *MIG1*, en liant à un métabolite pour le moment inconnu, pourrait interagir avec la DHFR d'*Arabidopsis thaliana* afin de moduler l'activité de cette dernière et, de ce fait, réguler la synthèse de THF notamment lors d'une perturbation de l'homéostasie en folates. La localisation dans le cytosol de *MIG1* est compatible avec cette hypothèse puisque chez *Arabidopsis* ce compartiment renferme une isoforme de la DHFR. Une fusion entre les domaines DHFR et FSH1 comme observée pour la DFR1 de *S. pombe* présenterait également l'avantage de rapprocher le domaine "régulateur" FSH1 de sa cible (Figure 8a). Il apparaît toutefois, que dans les conditions utilisées pour caractériser l'activité DHFR de la DFR1 de *S. pombe in vitro*, le domaine FSH1 ne module pas l'activité du domaine DHFR. Cependant, ces résultats sont valables uniquement dans les conditions du test utilisé. Ainsi, la complexification du test enzymatique par l'ajout de différentes molécules associées au métabolisme C1 pourrait permettre d'identifier le ligand de *MIG1*.

Une stratégie complémentaire envisagée afin d'identifier un ligand potentiel de *MIG1* consiste à utiliser la fluorescence des tryptophanes. En effet, la fluorescence intrinsèque des protéines est due principalement aux tryptophanes présents au niveau de la séquence primaire (et dans une moindre mesure aux tyrosines) et plus précisément au noyau indole de cet acide aminé. Les caractéristiques de cette fluorescence (longueur d'onde et intensité) sont modulées en fonction de l'environnement de ce noyau indole. Lorsque l'exposition d'un tryptophane est modifiée par un changement de conformation ou par la liaison d'un ligand, la fluorescence

intrinsèque de la protéine est également modifiée. Ainsi, le suivi par spectrofluorimétrie des modifications de la fluorescence émise par MIG1 lorsque celle-ci est mise en présence de différentes molécules permettra certainement d'isoler des ligands potentiels. Ces candidats pourront ensuite être inclus dans le test enzymatique permettant la mesure de l'activité DHFR afin de vérifier une éventuelle modulation de la synthèse de THF par MIG1. Cette technique de spectrofluorimétrie présente de nombreux avantages : outre le fait qu'il s'agit d'une technique relativement simple à mettre en œuvre, elle ne nécessite également que peu de matériel (Johnson et al, 1983).

La deuxième hypothèse avancée quant au rôle de MIG1 chez *Arabidopsis* est que cette protéine présente une activité enzymatique "liée" à celle de la DHFR, à savoir que le produit de la réaction catalysée par MIG1 tient lieu de substrat à la DHFR (Figure 8b). A la connaissance générale, la seule réaction catalysée par la DHFR est la réduction du DHF en THF ou celle de l'acide folique en DHF. MIG1 pourrait ainsi produire du DHF dans le cadre d'un système de recyclage du folate suite à une dégradation oxydative. Ces systèmes sont encore mal connus bien que l'équipe de Andrew Hanson en ait proposé un modèle (Orsomando et al, 2005 et 2006 ; Noiriél et al, 2007 ; Bozzo et al, 2008 et § B-III de la synthèse bibliographique de ce manuscrit). Il est cependant difficile d'attribuer à MIG1 un rôle dans le cadre de ce modèle de recyclage étant donné que l'activité enzymatique supposée de cette protéine consiste à cliver des liaisons peptidiques, ester, thioester ou des liaisons C-C ou C-O et que la plupart des protéines de recyclage du folate impliquées dans de telles réactions sont déjà identifiées et ne présentent pas d'homologie avec MIG1.

Il existerait une voie alternative d'oxydation des folates ne conduisant pas à un clivage du composé en C9-N10 tel que lors d'une dégradation oxydative (Anguera et al, 2003 ; Suh et al, 2001). Ainsi, Brookes et al (2002) ont constaté une oxydation non enzymatique rapide du 10-CHO-THF dans des cellules de rat, produisant ainsi du 10-CHO-DHF. Différentes équipes ont également formé *in vitro* du 5-CH<sub>3</sub>-DHF par oxydation du 5-CH<sub>3</sub>-THF (Donaldson et al, 1962 ; Lucock et al, 1995). MIG1, qui présente potentiellement une activité d'hydrolyse de certains types de liaisons covalentes, pourrait ainsi participer au recyclage de ces dérivés CHO-DHF et / ou CH<sub>3</sub>-DHF en clivant l'unité C1 afin que la partie DHF puisse être réduite par la DHFR pour donner du THF. Afin de tester cette possibilité, il serait intéressant de réaliser le test enzymatique de mesure d'activité DHFR en fournissant à la DFR1 de *S. pombe*, ou bien au système MIG1 / DHFR-TS, du 10-CHO-DHF ou du 5-CH<sub>3</sub>-DHF comme substrat, le premier des deux composés étant préparé par oxydation contrôlée du 10-CHO-THF (Baggott et al, 1995) alors que le 5-CH<sub>3</sub>-DHF est disponible dans le commerce (Schirck's Laboratories, Jona, Switzerland).

En parallèle et de façon complémentaire à l'étude *in vitro*, nous allons réaliser l'étude *in planta* du gène *MIG1*. A ce jour, nous ne disposons que de résultats préliminaires concernant la caractérisation de *MIG1*, mais tous les outils nécessaires à cette étude sont désormais disponibles au laboratoire (protéines recombinantes purifiées, lignées mutantes *mig*, lignées transgéniques 35S-*MIG1* et *MIG1::GUS*).



## E- MATERIELS ET METHODES.

### I- Matériel végétal.

#### 1- Culture de plantules d'*Arabidopsis thaliana*.

Les graines d'*Arabidopsis* sont semées sur terreau humide préalablement stérilisé puis conservées 48 h à 4°C et à l'obscurité. Elles sont ensuite placées en chambre de culture à 22°C avec un éclairage de 140  $\mu\text{mol}$  de photons  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . La photopériode est de 12 h / jour.

#### 2- Culture de cellules d'*Arabidopsis thaliana*.

Les cellules d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia) dérivent du méristème apical et sont chlorophylliennes. Elles sont cultivées à 22°C sous un éclairage permanent de 40  $\mu\text{mol}$  de photons  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  dans des ballons renfermant 200 ml de milieu de culture préparé selon Gamborg et al (1968) supplémenté par 15  $\text{g.L}^{-1}$  de saccharose. Une agitation de 125 rpm permet de maintenir les cellules en suspension et d'assurer une bonne solubilisation des gaz atmosphériques ( $\text{O}_2$  et  $\text{CO}_2$ ). Un repiquage à 5 % (volume de cellules après sédimentation / volume de milieu frais) est effectué tous les 7 jours.

### II- Surproduction et purification de protéines recombinantes en système bactérien.

#### 1- Clonage des ADNc codant les protéines d'intérêt dans le vecteur pET20b(+).

##### a- MIG1.

L'ADN complémentaire (ADNc) codant pour la protéine MIG1 a été commandé à l'"Arabidopsis Biological Resource Center" sous la référence U82272. Cet ADNc est intégré dans un plasmide pUNI51 qui porte également un gène de résistance à la kanamycine. La séquence codant pour MIG1 est amplifiée par PCR à partir du plasmide pUNI51-MIG1 en utilisant les amorces :

- pETMIG1-Nde : GAGACATATGGGAAGCGAAGGAAGAT
- pETMIG1-Xho : GAGACTCGAGTTTTGTTGGCTTACTAGTATTTTC

Le fragment amplifié est ensuite digéré par les enzymes de restriction NdeI et XhoI puis cloné dans le plasmide pET20b(+) en amont d'une étiquette 6 histidines.

##### b- DFR1.

L'ADNc codant la DFR1 de *Schizosaccharomyces pombe* a été obtenu par rétrotranscription (Verso<sup>TM</sup>cDNA Kit, ABgene<sup>®</sup>) à partir d'ARN totaux de *S. pombe* gracieusement fournis par le Dr André VERDEL de l'institut Albert Bonniot, Grenoble. La séquence codante de la DFR1 est ensuite amplifiée par PCR en utilisant les amorces :

- pET20-dfr1-Nde : GAGACATATGTCTAAGCCTTTAAAAGTGCTGTG
- pET20-dfr1-Xho: GAGACTCGAGACAAATACTAAGCTTTTCTAAAGCTACATTAAC

Le fragment amplifié est ensuite digéré par les enzymes de restriction NdeI et XhoI puis cloné dans le plasmide pET20b(+) en amont d'une étiquette 6 histidines.

## 2- Surproduction des protéines recombinantes en système bactérien.

Les constructions obtenues (pET20-MIG1-6His et pET20-DFR1-6His) codent pour des protéines fusionnées à une étiquette 6-His en C-terminal. Ces vecteurs sont ensuite multipliés dans la souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$ . Les différents plasmides sont transférés dans la souche d'expression *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysSRARE2 qui possède un plasmide portant les gènes de 7 codons rares ainsi que celui du T7 lysozyme (Novagen).

### a- Expression de DFR1-6His.

Les bactéries recombinantes sont cultivées dans du milieu Luria Bertani (LB) contenant de la carbénicilline 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  à 37°C jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) atteigne 0,6. L'induction de la synthèse de DFR1-6His est alors déclenchée par ajout d'IPTG à la concentration 40  $\mu\text{M}$ . L'induction est poursuivie 16 h à 16°C avant de collecter les bactéries par centrifugation.

### b- Expression de MIG1-6His.

Après de nombreux essais d'expression de la protéine MIG1-6His dans les conditions de culture les plus courantes, nous avons finalement adapté un protocole de la littérature (Oganesyan et al, 2007). Les bactéries recombinantes sont cultivées dans du milieu LB contenant de la carbénicilline 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  à 37°C jusqu'à ce que la  $\text{DO}_{600}$  atteigne 0,6. La culture est alors transférée dans un bain Marie à 47°C pendant 10 minutes. L'induction de la synthèse de MIG1-6His est alors déclenchée par ajout d'IPTG à la concentration 40  $\mu\text{M}$ . L'induction est poursuivie 20 min à 47°C puis 16 h à 16°C avant de collecter les bactéries par centrifugation. Le choc thermique réalisé au moment de l'induction déclenche la production de chaperonnes qui améliorent le repliement de la protéine recombinante.

## 3- Purification sur résine Ni-NTA des différentes protéines recombinantes.

Les bactéries sont resuspendues dans un tampon A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 8,0; 0,3 M NaCl) contenant 10 mM d'imidazole ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science<sup>®</sup>), lysées par sonication puis centrifugées 15 min à 23000 g à 4°C. L'extrait protéique soluble est ensuite déposé sur une colonne de nickel-nitrilotriacetic acid-agarose (Ni Sepharose<sup>™</sup> High Performance, GE Healthcare<sup>®</sup>) préalablement équilibrée par le tampon A contenant 10 mM d'imidazole. Après des lavages successifs par le tampon A supplémenté avec 10, 30 et 50 mM d'imidazole, la protéine recombinante est éluée par le tampon A contenant 250 mM d'imidazole. Les fractions d'éluion contenant la protéine recombinante sont rassemblées. Cet échantillon est ensuite déposé sur une colonne de dessalage PD10 afin d'éliminer le NaCl et l'imidazole puis concentré par centrifugation (Microsep, 10 kDa cutoff, Pall Filtron).

## III- Techniques d'analyse des protéines.

### 1- Dosage des protéines.

La quantité de protéines est estimée selon la technique mise au point par Bradford (1976) en utilisant la sérum albumine bovine comme standard.

### 2- Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE.

Deux volumes d'échantillon protéique sont dilués dans un volume de tampon de dépôt [concentration finale : Tris 62,5 mM ; pH 6,8 ; SDS 2 % (v/v) ; glycérol 10 % (v/v) ; bleu de bromophénol 0,05 % (v/v) ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 5 % (v/v)], puis sont dénaturés 3 min à 95 °C.

Les gels de polyacrylamide sont constitués d'un gel de concentration [acrylamide 5 % (p/v)] et d'un gel de séparation [acrylamide 10 % (p/v)]. L'électrophorèse est conduite à voltage constant (200 V) dans du tampon de migration [Tris 25 mM ; pH 8,3 ; glycine 192 mM ; SDS 0,1 % (p/v)], à température ambiante pendant 1 h. Après électrophorèse, les protéines sont colorées au bleu de Coomassie R-250.

#### IV- Mesure de l'activité dihydrofolate réductase de la protéine DFR1 de *S. pombe*.

Les enzymes possédant une activité DHFR catalysent la réaction:



Le protocole que nous avons suivi pour mesurer l'activité DHFR de la DFR1 est adapté de Neuburger et al (1996). Ce test enzymatique est basé sur la mesure de la décroissance de l'absorbance à 340 nm du NADPH qui est oxydé par la DHFR lors de la réduction du DHF.

L'activité de la DHFR de *S. pombe* est mesurée à température ambiante dans un volume réactionnel de 200  $\mu\text{L}$  de composition : 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$  ; pH 7,2 ; 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol ; 1 mM dithiothréitol ; 200  $\mu\text{M}$  NADPH et 0,8  $\mu\text{g}$  de la protéine DFR1 purifiée. La réaction est ensuite amorcée par l'ajout de 200  $\mu\text{M}$  de DHF.

Afin de valider le test dans ces conditions, nous avons effectué un contrôle positif en utilisant une enzyme commerciale, la DHFR de foie de bœuf (Sigma Aldrich®). La spécificité de la réaction est vérifiée par ajout de MTX à la concentration 0,5 nM.

Les données cinétiques sont traitées à l'aide du logiciel KaleidaGraph™ selon l'équation hyperbolique de Michaelis-Menten (2).

$$(2) \text{ V} = \frac{\text{V}_{\text{max}} \times [\text{substrat}]}{\text{K}_m + [\text{substrat}]}$$

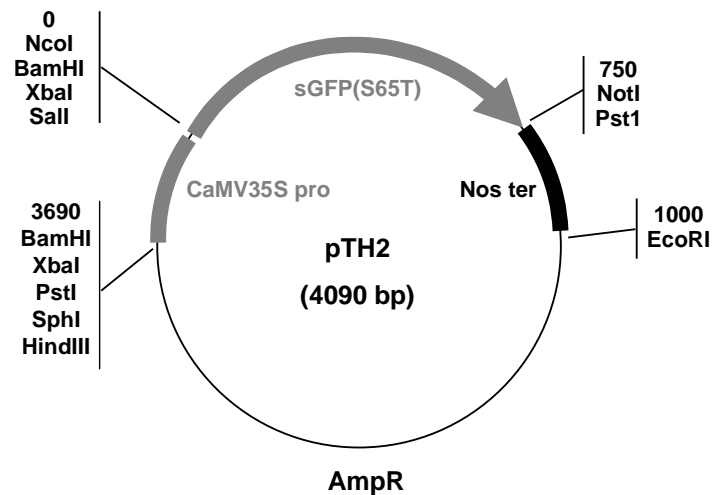
#### V- Localisation subcellulaire de la protéine de fusion MIG1-GFP par expression transitoire dans des protoplastes d'*Arabidopsis*.

##### 1- Clonage de l'ADNc codant MIG1 dans le vecteur pTH2.

La totalité de la séquence codante de MIG1 est amplifiée par PCR à partir du plasmide pUNI51-MIG1 en utilisant les amorces :

- pMIG1GFP-5' : GAGAGTCGACATGGGAAGCGAAGGAAGAT
- pMIG1GFP-3' : GAGAGTCGACTTTTGTGGCTTACTAGTATTTTC

Le fragment amplifié est ensuite digéré par l'enzyme de restriction SalI puis cloné dans le plasmide pTH2 (Niwa, 2003) en amont de la séquence codante pour la GFP et sous la dépendance du promoteur constitutif 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). La construction ainsi obtenue (pTH2-MIG1) est multipliée dans la souche d'*E. coli* DH5 $\alpha$ . Le plasmide est ensuite purifié puis utilisé pour transformer des protoplastes issus de cellules d'*Arabidopsis* en suspension.



**Figure 17** : Représentation schématique du vecteur pTH2 (Niwa , 2003).

## 2- Préparation et transformation de protoplastes d'*Arabidopsis*.

Cent mL de cellules d'*Arabidopsis* en suspension âgées de 4 jours sont rincées à l'eau osmosée et filtrées. Les cellules (environ 4 g) sont alors digérées 2 h à 28°C dans 8 mL de milieu de digestion (cellulase 2 % (p/v); pectolyase 0,25 % (p/v) ; mannitol 0,6 M ; Mes 25 mM ; pH 5,5). Le mélange est ensuite filtré sur une toile à blutter de taille de maille 78 µm. Les protoplastes ainsi isolés sont rincés 2 fois avec un tampon de rinçage (mannitol 0,7 M ; Tris 10 mM ; Mes 15 mM ; pH 6,3). Le dernier surnageant est alors éliminé puis le culot de protoplastes est repris dans 5 mL de milieu de culture [saccharose 0,4 M ; 4,3 g/L de sels Murashige and Skoog (Sigma Aldrich®), 4 mM CaCl<sub>2</sub> ; pH 5,8]. Cette suspension de protoplastes doit alors être conservée dans la glace jusqu'à utilisation.

La transformation est réalisée en mélangeant dans l'ordre :

- 100 µg d'ADN de sperme de saumon,
- 40 µg de la construction pTH2-MIG1,
- 250 µL de la suspension diluée à  $4.10^7$  protoplastes par ml,
- 350 µL d'une solution de PEG (PEG 6000 25 % (p/v) ; mannitol 0,45 M ; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,1 M ; pH 9,0).

Le mélange est incubé 30 min à température ambiante et à l'obscurité. Après ajout de 3 mL de milieu de culture, les protoplastes sont transférés en plaque de culture 6 puits à fond plat. Les protoplastes sont maintenus en survie à 22°C en faible éclairage pendant 24 à 48 h avant observation au microscope confocal.

## VI- Génotypage des mutants d'insertion d'*Arabidopsis*.

### 1- Extraction d'ADN génomique.

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) est effectuée selon Edwards et al (1991) à partir de plantules d'*Arabidopsis thaliana* âgées d'environ 15 jours. Après broyage au potier d'une feuille congelée dans de l'azote liquide, 400 µL de tampon d'extraction [Tris 200 mM ; pH 7,5 ; NaCl 250 mM ; EDTA 25 mM ; SDS 0,5 % (p/v)] sont ajoutés. Le mélange est alors centrifugé (16000 g, température ambiante, 1 min). Trois cents µL de surnageant sont prélevés, auxquels sont ajoutés 300 µL d'isopropanol. Le mélange est incubé 2 min à température ambiante puis centrifugé (16000 g, température ambiante, 5 min). Après

élimination du surnageant, l'ADNg est repris dans 100 µL de tampon TE [Tris 10 mM ; EDTA 0.1 mM ; pH 8,0].

## 2- Génotypage par PCR.

Les séquences des amorces utilisées pour amplifier les copies sauvages ou mutées de *MIG1* sont indiquées dans le tableau 1. Les amplicons issus de la PCR sont ensuite déposés sur gel d'agarose [agarose 1,4 % (p/v)]. L'électrophorèse est conduite à voltage constant (100 V) dans du tampon de migration [Tris-Acétate-EDTA 0,5 X ; bromure d'éthidium 500 ng / ml] à température ambiante pendant environ 20 min. Le gel est analysé sous UV.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'→3')
LB1	GGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG
Mig1-A	CGATCTCGTGTTCCTCGATGC
Mig1-C	AGACCATCGAAAGGACCAAGC
Mig1-E	CGAAGCAAGAGGGAAGACAAC

**Tableau 1** : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage des différents mutants knock-out pour le gène *MIG1*. L'amorce LB1 est spécifique de la bordure gauche de l'ADN-T pROK2.

## VII- Conception de lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*.

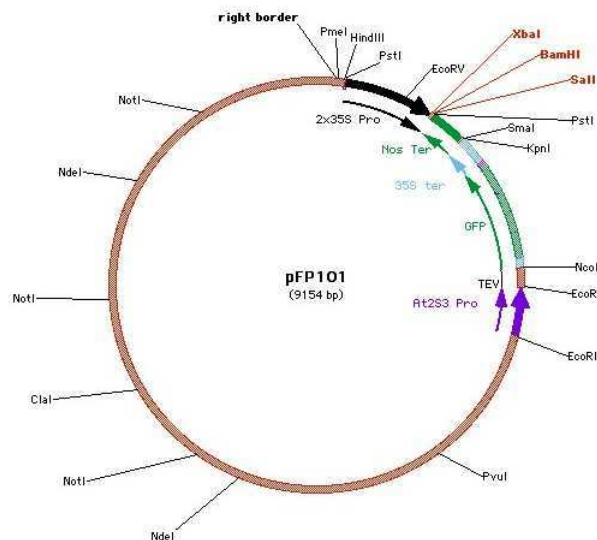
### 1- Lignées surexprimant le gène *MIG1*.

La séquence codante de *MIG1* est amplifiée par PCR à partir de la construction pET20-*MIG1*-6His en utilisant les amorces du tableau 2 qui permettent d'ajouter en 5' et 3' de la séquence d'intérêt des sites de restriction pour les enzymes XbaI et BamHI, respectivement. Le fragment obtenu est alors inséré dans le plasmide pPCR-Script™ selon les indications du fournisseur (Stratagene®).

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'→3')
pFP101MIG1-Xba	GAGATCTAGAAAAAATGGGAAGCGAAGGAAGAT
pFP101MIG1-6HisBam	CTCTGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTG

**Tableau 2** : Séquences des amorces utilisées pour le clonage de *MIG1* dans le vecteur pPCR-Script™.

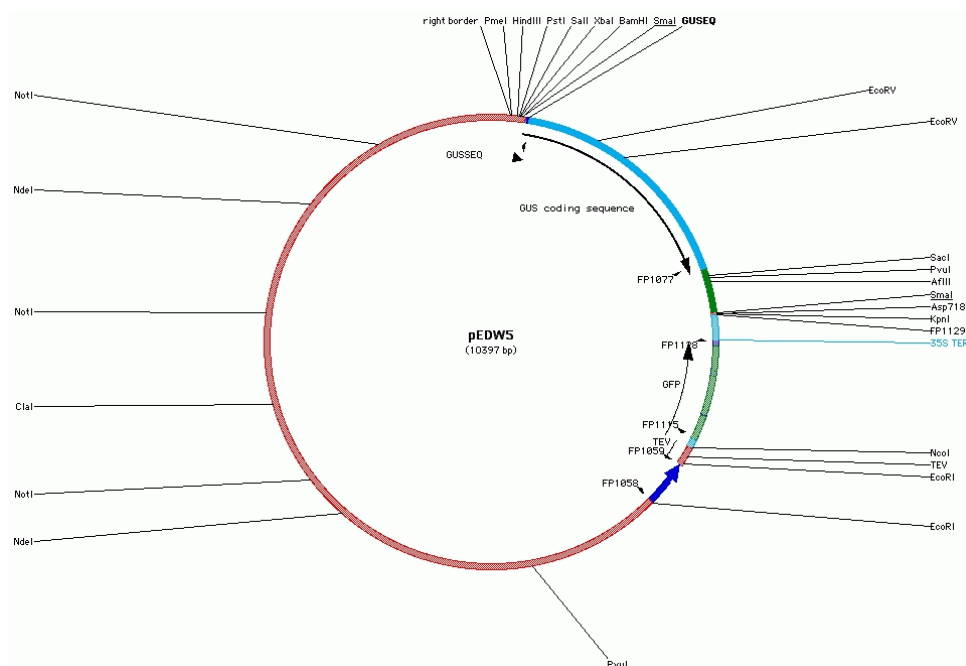
La construction pPCR-Script-*MIG1* est digérée par les enzymes de restriction XbaI et BamHI. Le fragment obtenu est alors inséré dans le vecteur pFP101 (Figure 18). Ce plasmide, construit par G. Lambert et F. Parcy, présente l'intérêt de permettre une sélection rapide des graines transformées. En effet, pFP101 porte le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur At2S3 spécifique de la graine. Ainsi, les graines ayant intégrées la construction peuvent être sélectionnées sur la base de la fluorescence de la GFP (Bensmihen et al, 2004). De plus, la présence d'un double promoteur constitutif CaMV 35S en amont du transgène permet une très forte expression de celui-ci dans l'ensemble des territoires de la plante.



**Figure 18** : Représentation schématique du vecteur pFP101.

**2- Lignées exprimant une fusion transcriptionnelle et traductionnelle *MIG1::GUS*.**

Les amorces MIG1GUS5' (GAGACTGCAGTGAAGCAACTGTTCAACTTC) et MIG1GUS3' (GAGAGGATCCGATTTTGTTGGCTTACTAGTATTTTC) qui permettent d'ajouter en 5' et 3' de la séquence d'intérêt des sites de restriction pour les enzymes PstI et BamHI, respectivement, sont utilisées pour amplifier, à partir d'ADNg de plantule sauvage d'*Arabidopsis thaliana*, la séquence du gène *MIG1* ainsi que sa région promotrice potentielle. Cette dernière correspond aux 500 pb en amont du codon initiateur de la traduction de *MIG1*. Elle s'étend jusqu'à l'extrémité 5' du gène précédent (At4g24370) situé sur le brin complémentaire. Le fragment amplifié est ensuite cloné dans pPCR-Script™ selon les indications du fournisseur (Stratagene®). La construction pPCR-Script-MIG1-GUS est digérée par les enzymes de restriction PstI et BamHI. Le fragment obtenu est alors inséré dans le vecteur pEDW5 (Figure 19). Le plasmide pEDW5, construit à partir de pFP101 par E. Moyroud au laboratoire PCV, permet de sélectionner les graines transformées sur la base de la fluorescence de la GFP



**Figure 19** : Représentation schématique du vecteur pEDW5.

### **3- Transformation de plantules d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobacterium tumefaciens*.**

La transformation de plantules d'*Arabidopsis* est basée sur le protocole de Zhang et al (2006). Des plantules d'*Arabidopsis* (écotype Col 8) sont cultivées jusqu'à apparition des premières siliques matures. La souche d'*A. tumefaciens* C58C1 pMP90 (Koncz et Schell, 1986), préalablement transformée par l'une des constructions pFP101-MIG1 ou pEDW5-MIG1 par électroporation, est mise en culture jusqu'à une  $DO_{600}$  d'environ 2. Les bactéries sont ensuite culotées puis resuspendues dans un milieu saccharose 5 % (p/v) et Silwett L77 0,02 % (v/v). Après avoir éliminé les siliques matures, les plantules sont entièrement immergées dans la suspension d'agrobactéries durant 5 secondes puis remises en culture, en faible éclairage pendant 48 h, puis en conditions classiques. Une fois les graines récoltées, elles sont triées sous une loupe GFP.

# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

---





## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Différentes études antérieures à ce travail de thèse ont démontré que la synthèse ainsi que l'accumulation du folate varient fortement au cours du développement de la plante et cela en fonction du territoire mais également du stade de développement (Jabrin et al, 2003). De ce fait, dans les tissus en forte division cellulaire (méristèmes, cellules en culture, embryons) ainsi que dans les jeunes feuilles vertes où le métabolisme C1 est particulièrement actif, certaines enzymes de la voie de biosynthèse du folate présentent une forte accumulation et les concentrations en folate sont très élevées. En revanche, les tissus caractérisés par une activité métabolique faible (racines, fruits) présentent des teneurs en folates réduites liées à une faible expression de ces mêmes enzymes (Jabrin et al, 2003 ; Basset et al, 2002 ; Basset et al, 2004a et b). Ainsi, différents essais d'ingénierie métabolique consistant à surexprimer ces enzymes chez la tomate et le riz ont permis d'accroître leur teneur en vitamine B9 de respectivement 25 et 100 fois (Diaz de la Garza et al, 2007 ; Storozhenko et al, 2007a). En dépit de ces manipulations génétiques de la voie de biosynthèse du THF, de nombreuses interrogations demeurent concernant la régulation du métabolisme du folate et notamment la question de l'adaptation de la synthèse et de l'accumulation du THF dans le but de subvenir aux besoins fluctuants de la plante en unités C1.

Pour répondre à cette question, l'équipe de John King (Prabhu et al, 1996 et 1998 ; Li et al, 2003) a développé une stratégie qui consiste à utiliser des molécules antifolates, qui sont le méthotrexate (MTX) et le sulfanilamide, afin de bloquer la voie de biosynthèse de THF puis à en analyser les conséquences sur l'évolution des pools de sérine et de glycine par RMN du  $^{13}\text{C}$ . Les auteurs ont ainsi démontré que le flux de carbone à travers le complexe GDC / SHMT requière une alimentation continue en THF. Ils ont également pu mettre en évidence un effet plus marqué du traitement au MTX, qui bloque la synthèse *de novo* de folate mais également son recyclage, par rapport à l'effet provoqué par le sulfanilamide qui, lui, inhibe uniquement la synthèse *de novo* de THF. Ce dernier point illustre le rôle prépondérant du recyclage des folates dans le maintien de l'homéostasie de ces cofacteurs.

Lors de ce travail de thèse, nous avons donc employé une stratégie similaire à celle développée par J. King en inhibant, dans des cellules d'*Arabidopsis*, la synthèse de THF et ce dans le but d'analyser la réponse des gènes impliqués dans l'homéostasie du folate et plus généralement le métabolisme C1.

De façon surprenante, les cellules d'*Arabidopsis* ne semblent pas mettre en place de processus transcriptionnel afin de compenser la diminution du pool de folates. En effet, aucun gène codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse du THF ne présente de différence d'expression suite au traitement au MTX. Un comportement similaire a pu être observé chez *Plasmodium falciparum*. En effet, une étude transcriptomique menée chez ce parasite autotrophe pour le folate a démontré qu'un traitement à l'aide d'un antifolate ciblant la DHFR (le WR99120) n'induisait aucune modification de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du folate (Ganesan et al, 2008). En revanche, il apparaît que les cellules de mammifères, dans le cas présent des cellules de hamster, lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu pauvre en folates, présentent une augmentation de 5 à 6 fois de l'activité et de la quantité de DHFR. Cette accumulation n'est cependant pas la conséquence d'une surexpression du gène correspondant mais vraisemblablement à un mécanisme de régulation post-transcriptionnel (Zhu et al, 2002).

Si, au niveau transcriptionnel, *Arabidopsis* ne dispose pas de système visant à compenser la diminution du pool intracellulaire de folates, il s'avère qu'elle réagit à un déficit en vitamine B9 en jouant sur la qualité des folates encore disponibles. Ainsi, la FPGS cytosolique présente une induction de son expression suite au traitement au MTX, favorisant de la sorte l'accumulation de formes polyglutamates du cofacteur vitaminique. De la même façon, une surexpression du gène codant la FPGS de plus de 400 % a été observée chez certaines lignées de cellules de l'épithélium intestinal humain en situation de carence en folate (Hayashi et al, 2007). Une augmentation de l'activité FPGS permet non seulement de stabiliser et retenir le THF dans la cellule, mais également conduit à accroître l'affinité des folates vis-à-vis des enzymes folates-dépendantes (McGuire et Bertino, 1981 ; Strong et al, 1990 ; Rébeillé et al, 1994), ce qui constitue un facteur de survie important lors de l'adaptation à une carence en folates. De plus, il a été constaté, qu'en cas de déficience en folates, les cellules animales favorisent l'entrée puis la séquestration des folates en surexprimant les systèmes d'import du THF dans la cellule mais également en réprimant les gènes codant pour l'efflux du THF (Ifergan et Assaraf, 2008).

Lors de l'étude transcriptomique, nous avons constaté des changements dans l'expression de différents gènes codant pour des enzymes impliquées dans le chargement d'unités C1 sur le THF ou dans l'interconversion des différents dérivés du cofacteur vitaminique. Ainsi, les deux CH<sub>2</sub>-THF réductases qui catalysent la formation de 5-CH<sub>3</sub>-THF sont réprimées par le traitement au MTX. Il en est de même pour une isoforme mitochondriale de la SHMT ainsi que pour différentes sous-unités de la GDC, ce qui traduit une réduction de l'activité métabolisme au sein de la mitochondrie. En revanche, une isoforme chloroplastique de la SHMT ainsi que la FTHFS sont surexprimées de façon précoce suite au traitement au MTX. Ainsi, lors d'une diminution du pool de folates, la cellule végétale favorise l'accumulation de 10-CHO-THF et / ou de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF au détriment du 5-CH<sub>3</sub>-THF qui est pourtant, en situation physiologique, le dérivé de THF le plus abondant. L'ensemble de ces éléments suggère une réorientation du flux d'unités monocarbonées dans le plaste en faveur de la synthèse de 10-CHO-THF et / ou de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF afin d'alimenter la synthèse des nucléotides (purines et thymidylate) dans ce compartiment et ce au dépend des réactions de méthylation.

En dépit de la rigidité du transcriptome constatée chez *Plasmodium* après un traitement antifolate, deux gènes présentent une surexpression en situation de déficience en folates, il s'agit de la SHMT et de la ribonucléotide réductase 2 impliquée dans le métabolisme des nucléotides (Ganesan et al, 2008).

Chez les animaux la situation semble relativement similaire puisque Hayashi et al (2007) ont également observé une répression de la MTHFR ainsi qu'une surexpression de la SHMT cytosolique chez des cellules Caco2 cultivées en milieu pauvre en folates. Les auteurs en arrivent à des conclusions similaires aux nôtres, à savoir que dans ces cellules Caco2, la priorité métabolique est donnée à la synthèse des nucléotides lorsque la disponibilité en folates est limitée (Hayashi et al, 2007). Il a d'ailleurs été démontré par l'équipe de P. Stover (Herbig et al, 2002 ; MacFarlane et al, 2008) que chez les mammifères, la SHMT cytosolique joue le rôle d'interrupteur métabolique et permet ainsi de réguler les flux d'unité C1 entre la TS, pour la synthèse du thymidylate, et la MTHFR, pour la synthèse de méthionine. Cette équipe, en travaillant sur des souris KO pour le gène de la SHMT mitochondriale, a prouvé que, si l'isoforme mitochondriale de cette enzyme est essentielle à l'approvisionnement de la cellule en 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, la forme cytosolique, elle, n'est pas vitale mais joue un rôle dans la partition du flux d'unités C1 entre les voies de synthèse des nucléotides et celle de méthionine. En effet, les souris mutantes sont viables et fertiles mais souffrent tout de même d'une altération des pools de SAM et d'uracile. Selon Herbig et al (2002) une surexpression

de la SHMT cytosolique aurait tendance à favoriser la voie de biosynthèse du thymidylate au détriment de la synthèse de méthionine et de SAM.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Gelling et al (2004) ont constaté qu'une diminution du pool de 5,10-CH<sub>2</sub>-THF conduit à l'induction de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme C1, notamment la SHMT cytosolique. Les auteurs, qui ont alors désigné l'ensemble de ces gènes par le terme de "C1-régulon", ont également observé une co-régulation entre ce dernier et des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des purines.

L'analyse transcriptomique de la réponse des cellules d'*Arabidopsis* à un traitement au MTX ayant permis de mettre en évidence une redistribution des unités C1 à travers les différentes voies utilisatrices de THF, la suite de ce travail de thèse a logiquement consisté à étudier le comportement des voies folate-dépendantes en situation de déficience en folates.

Prabhu et al (1996 et 1998) ont observé une inhibition, suite à un traitement au MTX, du flux de carbone à travers le complexe mitochondrial GDC / SHMT se traduisant par une diminution de la synthèse de sérine. Nous avons, nous-mêmes, constaté une diminution de l'abondance des transcrits correspondant à la GDC, à la SHMT mitochondriale mais également à la petite sous-unité de la Rubisco lors de la diminution du pool de folates. Ces enzymes font partie de voies considérées comme grandes consommatrices d'unités C1 (photorespiration et en conséquence photosynthèse) et assurent donc un fort turnover des folates au sein de la cellule. Leur répression participe certainement au déséquilibre constaté entre les différents dérivés du THF. En effet, le 5-CH<sub>3</sub>-THF qui, en temps normal, constitue le folate le plus abondant au sein de la cellule, devient minoritaire lors du traitement au MTX, ce qui implique une réduction de l'alimentation de la voie de biosynthèse de méthionine et donc de SAM. Cette dernière joue pourtant un rôle essentiel puisqu'elle constitue le donneur universel de groupements méthyles chez tous les êtres vivants. Les réactions de méthylation SAM-dépendantes touchent de nombreux métabolites et macromolécules, telles que les protéines ou l'ADN, et concernent donc l'ensemble des processus cellulaires (métabolisme, expression du génome, etc.). Lors de l'établissement du déficit en folate induite par le MTX, les niveaux de méthionine et de SAM sont fortement réduits, mais nous avons également constaté une augmentation de la quantité intracellulaire de SAH. Or, il est connu que les méthyltransférases sont fortement inhibées par la SAH et sensibles au ratio SAM / SAH, plus connu sous le nom d'index de méthylation (IM). Or le traitement au MTX induit une diminution, allant jusqu'à 40 fois, de l'IM des cellules d'*Arabidopsis*. Au vue de l'importance des réactions de méthylation pour le maintien du métabolisme et compte tenu du fait que nous n'avons pas observé de régulation transcriptionnelle des méthyltransférases, il semble essentiel pour la survie de la cellule de limiter les variations de l'IM. Différents mécanismes de régulation de l'IM ont été mis en évidence. Ainsi, l'équipe de S. Naito (Onouchi et al, 2005) a proposé un modèle de régulation post-transcriptionnel de la CGS *via* le domaine MTO en situation d'excès en SAM. Au laboratoire, nous avons démontré qu'une augmentation des pools de méthionine et de SAM provoque une accumulation de la quantité de méthionine  $\gamma$ -lyase (MGL), enzyme qui catalyse l'hydrolyse de la méthionine en ammoniac,  $\alpha$ -cétobutyrate et méthanethiol (Rébeillé et al, 2006). Dans la mesure où nous n'avons pas constaté d'augmentation de la quantité de transcrit *MGL*, cette accumulation de l'enzyme est vraisemblablement due à une régulation post-transcriptionnelle. Nous avons finalement pu mettre en évidence un troisième mécanisme de contrôle de l'IM qui passe par la régulation de l'activité de la CGS en situation de déficit en folate *via* le clivage de l'extrémité N-terminale de cette enzyme. A ce jour, nous n'avons pas identifié les conditions physiologiques qui provoquent la mise en place d'un tel mécanisme. Il serait cependant intéressant de réaliser des expériences de western-blot sur des extraits protéiques préparés à partir de différents tissus et / ou d'organes de plantules d'*Arabidopsis* et ce afin de visualiser

ou non le clivage de la CGS. En effet, les cellules présentant un clivage de la CGS renferment des teneurs en folates comparables à celles retrouvées, en conditions physiologiques, dans les tissus où l'activité métabolique est réduite, notamment dans les racines ou la tige (Jabrin et al, 2003). Une alternative à cette méthode consisterait à contrôler par PCR quantitative en temps réel l'expression, dans différents tissus d'*Arabidopsis*, de la (ou des) protéase(s) impliquée(s) dans le clivage de la CGS. L'étude de lignées exprimant le gène de la glucuronidase sous la dépendance du promoteur de la protéase pourrait être menée en parallèle. Cependant, aucun gène de protéase susceptible d'intervenir dans cette modification post-traductionnelle n'a été identifié lors de l'étude transcriptomique. Pour y remédier, une purification de la protéase à partir d'un extrait protéique de cellules d'*Arabidopsis* traitées au MTX pourrait être envisagée. L'identification de la protéase se ferait alors par séquençage par spectrométrie de masse.

La principale conclusion qu'offre ce travail de thèse est qu'il est indispensable pour la plante de préserver le pool de SAM et de maintenir son IM. Il apparaît néanmoins, qu'en situation de déficit en folates, les cellules d'*Arabidopsis* donnent la priorité aux voies de synthèse des nucléotides. Une étude menée sur deux lignées de cellules de l'épithélium intestinal humain démontre que la réponse à une carence en folate peut-être cellule-spécifique (Hayashi et al, 2007). En effet, alors que la lignée HCT116 favorise la synthèse de méthionine et donc les réactions de méthylation, la lignée Caco2 présente, elle, un comportement identique aux cellules d'*Arabidopsis* traitées au MTX en favorisant la synthèse des nucléotides au détriment des réactions de méthylation.

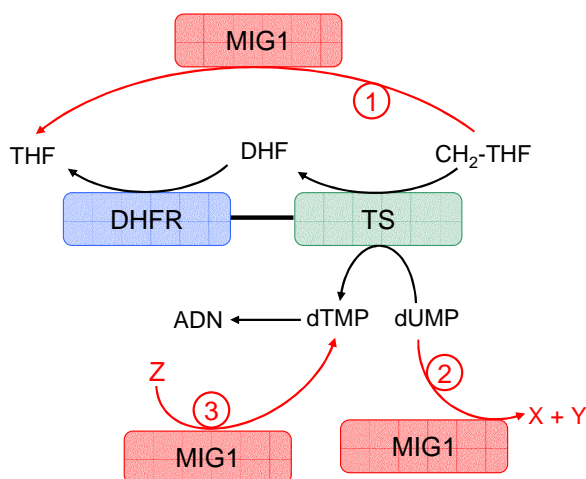
La redistribution des unités C1 vers la voie de synthèse des purines et du thymidylate est, comme indiqué plus haut, un phénomène observé lors d'une diminution du pool de folates chez *Arabidopsis*, mais également chez *Plasmodium falciparum* (Ganesan et al, 2008), sur des cellules de mammifères (Hayashi et al, 2007 ; Herbig et al, 2002 ; MacFarlane et al, 2008) et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Gelling et al, 2004), ce qui suggère l'existence de systèmes de coordination entre les métabolismes du folate et des nucléotides extrêmement conservés entre les espèces eucaryotes.

L'équipe de SJ. James s'est particulièrement intéressée aux conséquences d'une déficience en folates sur le métabolisme des nucléotides (James et al, 1994 ; Melnyk et al, 1999). En effet, une disponibilité adéquate du THF est requise pour la synthèse du noyau purique et pour la méthylation du dTMP en dUMP par la TS. Or, dans des cellules carencées en folate, James et al (1994) et Melnyk et al (1999) observent une augmentation du pool de dUTP allant jusqu'à 600 %, une diminution du dTTP accompagnées d'un blocage de la division cellulaire, un taux de mortalité élevé, ainsi qu'une fragmentation de l'ADN caractéristique du phénomène d'apoptose. Ces résultats confirment la nécessité pour la cellule de maintenir la synthèse de dNTP et ce malgré la carence en folates, d'autant plus que la taille du pool de dNTP permet d'alimenter la synthèse d'ADN pendant seulement 30 secondes à 3 minutes (Meuth et al, 1989). Le MTX, s'il inhibe principalement la DHFR, possède également une cible secondaire : la TS (McGuire, 2003). Cette dernière est également inhibée par une accumulation de DHF (McGuire, 2003). En effet, celui-ci ne représente qu'une infime proportion des folates cellulaires en situation physiologique. Cependant, lors d'un traitement au MTX, la DHFR étant elle-même inhibée, le DHF s'accumule et représente alors une proportion non négligeable du pool de folates (cf Chapitre I). Il est donc probable que l'on puisse mesurer une forte augmentation de la quantité de dUTP ainsi qu'une diminution du pool de dTTP dans les cellules d'*Arabidopsis* traitées au MTX. Lors de l'étude de la protéine MIG1, il serait intéressant de le vérifier en pratiquant un dosage des dNTP sur des cellules carencées.

Les hypothèses que nous avons formulées précédemment quant au rôle de MIG1 (Chapitre IV) proposent une interaction entre cette dernière et la DHFR. Les différents éléments présentés ici ainsi que les données concernant FSH3 (qui serait impliqué dans la coordination entre la synthèse du folate et celle des nucléotides) nous orientent alternativement vers une coopération entre MIG1 et la TS. Dans ce cas de figure, MIG1 pourrait jouer différents rôles, notamment celui de convertir le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF en THF grâce à son activité hydrolase (Figure 1). En effet, la TS étant inhibée par le MTX et donc incapable d'utiliser le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, MIG1 permettrait alors de recycler ce dérivé en le réinjectant dans le métabolisme C1 sous forme de THF.

Alternativement, MIG1 pourrait utiliser le dUMP comme substrat (Figure 1). En effet, en situation de carence en folates, le ratio dUTP / dTTP augmente jusqu'à 10 fois dans des cellules de mammifère (James et al, 1994). L'accumulation de dUTP et le déficit en dTTP provoquent alors une incorporation erronée d'uracile dans l'ADN. Les systèmes de réparation ne disposant plus de thymidylate, ils sont incapables de corriger ces erreurs, les brins d'ADN des cellules carencées en folates présentent alors des cassures, des sites abasiques ou bien des substitutions T→U. L'apoptose intervient alors afin d'éliminer les cellules porteuses de ces aberrations de l'ADN (Basnakian et James, 1994). MIG1, en dégradant une partie du dUMP en excès, pourrait limiter les incorporations erronées d'uracile dans l'ADN. La corrélation établie entre la diminution de l'expression de la sérine-hydrolase OVCA2 et l'apparition de certains cancers ainsi que l'hypothèse selon laquelle cette protéine jouerait son rôle de suppresseur de tumeur *via* le déclenchement de l'apoptose (Azizi et al, 2006) viennent supporter ce rôle potentiel de MIG1. Cependant les enzymes du catabolisme de l'UMP sont identifiées (Mainguet et al, 2009) et ne présentent pas d'homologie avec MIG1 ou les sérine-hydrolases.

Finalement, le rôle de MIG1 pourrait consister à produire du thymidylate (Figure 1) afin de maintenir une certaine homéostasie des bases pyrimidiques lors d'un déficit en folates, celle des purines étant assurée par une réorientation des unités C1. La seule enzyme connue pour réaliser la synthèse de dTMP est la TS. Or, la séquence protéique de MIG1 ne présentant aucune homologie avec cette dernière, MIG1 participerait alors à une voie alternative de synthèse de dTMP jusqu'à présent inconnue.



**Figure 1 : Représentation schématique des rôles potentiels de MIG1 dans la régulation du métabolisme C1 en cas de carence en folates (selon l'hypothèse d'une interaction avec la TS).**

Dans le cas de figure N°1, MIG permettrait de recycler le CH<sub>2</sub>-THF en THF pour le réinjecter dans le métabolisme C1. Dans le cas de figure N°2, MIG1 limite l'accumulation de dUMP en le dégradant et diminue ainsi la fréquence d'incorporations erronées d'uracile dans l'ADN. Finalement, dans le cas de figure N°3, MIG1 est impliquée dans une voie alternative de synthèse de dTMP et permet ainsi de maintenir un certain équilibre dans le pool de dNTP.

Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse ont donc permis de répondre en partie aux interrogations concernant la distribution des unités C1 et le comportement des différentes voies anaboliques folate-dépendantes en situation de déficience en THF. Cependant, d'autres questions restent en suspens et notamment celle de la régulation de l'homéostasie en folates dans le but de subvenir aux besoins en unités C1. Différents travaux consistant à analyser la réponse à une perturbation de la demande en unités C1 ont été réalisés au laboratoire.

En effet, lors de sa thèse, Samuel Jabrin a observé, en supplémentant en méthionine des cellules d'*Arabidopsis*, une diminution de la teneur intracellulaire en folate d'environ 30 %. Il n'a cependant pas pu mettre en évidence de modification d'expression des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du folate (NB : seule l'expression de 3 enzymes sur 10 a été analysée par western-blot). S. Jabrin a également réalisé l'expérience inverse, à savoir perturber la demande en unités C1 en supplémentant des cellules d'*Arabidopsis* en homocystéine. Il a alors observé une augmentation du pool de folates de l'ordre de 30 % mais encore une fois sans modification de la quantité des enzymes de synthèse du THF. Ces travaux n'ayant pas été poussés plus en avant, il serait intéressant de réaliser des dosages de folates dans les deux conditions de supplémentation afin de contrôler l'existence d'un déséquilibre des dérivés du THF tel que nous avons pu l'observer suite au traitement au MTX. L'analyse par PCR quantitative en temps réel pourrait également mettre en évidence une éventuelle réponse au niveau transcriptionnel des enzymes de synthèse du folate mais également des enzymes réalisant l'interconversion des différents dérivés du THF.

Une approche supplémentaire consisterait à perturber la demande en unités C1 des autres voies anaboliques comme la synthèse de sérine et de glycine ou les synthèses des nucléotides et du thymidylate puis d'en mesurer les conséquences sur l'homéostasie des folates. Ainsi, Mouillon et al (1999) ont constaté, en utilisant la RMN du  $^{13}\text{C}$ , qu'un excès de glycine était rapidement résorbé par l'oxydation de cette dernière *via* le complexe de la GDC. En revanche, la conversion sérine-glycine, dans le cadre d'un excès de sérine, est beaucoup plus lente, le THF utilisé par la SHMT lors de cette réaction constituant possiblement un facteur limitant. Il est également possible de perturber le métabolisme des nucléotides en supplémentant le milieu de culture de plantules d'*Arabidopsis* en nucléosides (Howles et al, 2006), les nucléotides n'étant pas capables de traverser la paroi des cellules (Gazziola et al, 2001). Chez les mammifères, en cas d'excès de l'un des dNTP, des nucléotidases déphosphorylent les nucléotides en nucléosides, ces derniers sont alors soit excrétés hors de la cellule soit dégradés après désamination (Reichard, 1988 ; Gazziola et al, 2001).

Le folate tient un rôle essentiel au sein de la cellule puisqu'il est la base du métabolisme C1. Le travail effectué dans le cadre de ma thèse démontre clairement que le métabolisme du folate possède une grande flexibilité permettant aux cellules d'*Arabidopsis* et probablement aux plantes de façon plus générale, de s'adapter à une perturbation dans l'homéostasie de ce cofacteur vitaminique. Nous avons ainsi mis en évidence trois niveaux de réponse à un déficit en folates : transcriptionnel pour un nombre restreint de gènes qui vont assurer une réorientation des unités C1, métabolique *via* le contrôle de l'activité des méthyltransférases par l'index de méthylation, et enfin post-traductionnel en ce qui concerne la synthèse de méthionine. La complexité et la multiplicité de ces mécanismes de régulation, ainsi que l'implication du métabolisme C1 dans l'ensemble des processus cellulaires, font du métabolisme du folate un univers fascinant qui n'a pas encore révélé tout ses secrets...

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Alaimo, K., McDowell, M.A., Briefel, R.R., Bischof, A.M., Caughman, C.R., Loria, C.M., and Johnson, C.L.** (1994). Dietary Intake of Vitamins, Minerals, and Fiber of Persons Ages 2 Months and over in the United States: Third National Health and Nutrition Examination Survey, Phase 1, 1988-91. *Adv Data*, 1-28.

**Alexander, F.W., Sandmeier, E., Mehta, P.K., and Christen, P.** (1994). Evolutionary Relationships among Pyridoxal-5'-Phosphate-Dependent Enzymes. Regio-Specific Alpha, Beta and Gamma Families. *Eur J Biochem* **219**, 953-960.

**Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H.M., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R.** (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis Thaliana*. *Science* **301**, 653-657.

**Angier, R.B., Boothe, J.H., Hutchings, B.L., Mowat, J.H., Semb, J., Stokstad, E.L., Subbarow, Y., Waller, C.W., Cosulich, D.B., Fahrenbach, M.J., Hultquist, M.E., Kuh, E., Northey, E.H., Seeger, D.R., Sickels, J.P., and Smith, J.M., Jr.** (1946). The Structure and Synthesis of the Liver L. Casei Factor. *Science* **103**, 667-669.

**Anguera, M.C., Suh, J.R., Ghandour, H., Nasrallah, I.M., Selhub, J., and Stover, P.J.** (2003). Methenyltetrahydrofolate Synthetase Regulates Folate Turnover and Accumulation. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 29856-29862.

**Appling, D.R.** (1991). Compartmentation of Folate-Mediated One-Carbon Metabolism in Eukaryotes. *Faseb J* **5**, 2645-2651.

**Aslinia, F., Mazza, J.J., and Yale, S.H.** (2006). Megaloblastic Anemia and Other Causes of Macrocytosis. *Clin Med Res* **4**, 236-241.

**Azizi, A.A., Gelpi, E., Yang, J.W., Rupp, B., Godwin, A.K., Slater, C., Slavic, I., and Lubec, G.** (2006). Mass Spectrometric Identification of Serine Hydrolase *Ovca2* in the Medulloblastoma Cell Line Daoy. *Cancer Letters* **241**, 235-249.

**Baggott, J.E., Johanning, G.L., Branham, K.E., Prince, C.W., Morgan, S.L., Eto, I., and Vaughn, W.H.** (1995). Cofactor Role for 10-Formyldihydrofolic Acid. *Biochemical Journal* **308**, 1031-1036.

**Basnakian, A.G., and James, S.J.** (1994). A Rapid and Sensitive Assay for the Detection of DNA Fragmentation During Early Phases of Apoptosis. *Nucleic Acids Research* **22**, 2714-2715.

- Basset, G., Quinlivan, E.P., Ziemak, M.J., Diaz De La Garza, R., Fischer, M., Schiffmann, S., Bacher, A., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2002). Folate Synthesis in Plants: The First Step of the Pterin Branch Is Mediated by a Unique Bimodular Gtp Cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12489-12494.
- Basset, G.J., Quinlivan, E.P., Ravanel, S., Rebeille, F., Nichols, B.P., Shinozaki, K., Seki, M., Adams-Phillips, L.C., Giovannoni, J.J., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2004a). Folate Synthesis in Plants: The P-Aminobenzoate Branch Is Initiated by a Bifunctional Paba-Pabb Protein That Is Targeted to Plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1496-1501.
- Basset, G.J., Ravanel, S., Quinlivan, E.P., White, R., Giovannoni, J.J., Rebeille, F., Nichols, B.P., Shinozaki, K., Seki, M., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2004b). Folate Synthesis in Plants: The Last Step of the P-Aminobenzoate Branch Is Catalyzed by a Plastidial Aminodeoxychorismate Lyase. *Plant J* **40**, 453-461.
- Bauwe, H., and Kolukisaoglu, U.** (2003). Genetic Manipulation of Glycine Decarboxylation. *J Exp Bot* **54**, 1523-1535.
- Bedhomme, M., Hoffmann, M., McCarthy, E.A., Gambonnet, B., Moran, R.G., Rebeille, F., and Ravanel, S.** (2005). Folate Metabolism in Plants: An Arabidopsis Homolog of the Mammalian Mitochondrial Folate Transporter Mediates Folate Import into Chloroplasts. *J Biol Chem* **280**, 34823-34831.
- Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J., and Parcy, F.** (2004). Analysis of an Activated *Abi5* Allele Using a New Selection Method for Transgenic Arabidopsis Seeds. *Febs Letters* **561**, 127-131.
- Bertani, L.E., and Campbell, J.L.** (1994). The Isolation and Characterization of the Gene (*Dfr1*) Encoding Dihydrofolate-Reductase (*Dhfr*) in *Schizosaccharomyces-Pombe*. *Gene* **147**, 131-135.
- Besson, V., Rebeille, F., Neuburger, M., Douce, R., and Cossins, E.A.** (1993). Effects of Tetrahydrofolate Polyglutamates on the Kinetic Parameters of Serine Hydroxymethyltransferase and Glycine Decarboxylase from Pea Leaf Mitochondria. *Biochem J* **292** ( Pt 2), 425-430.
- Bhutta, Z.A., and Hasan, B.** (2002). Supplémentation Périconceptionnelle En Folates Et/Ou Multivitamines Dans La Prévention Des Anomalies Du Tube Neural: Commentaires De La Bsg. Bibliothèque de la santé génésique de l'OMS; Genève: Organisation mondiale e la Santé.
- Block, M.A., Tewari, A.K., Albrieux, C., Marechal, E., and Joyard, J.** (2002). The Plant S-Adenosyl-L-Methionine:Mg-Protoporphyrin IX Methyltransferase Is Located in Both Envelope and Thylakoid Chloroplast Membranes. *Eur J Biochem* **269**, 240-248.
- Blom, H.J., Shaw, G.M., den Heijer, M., and Finnell, R.H.** (2006). Neural Tube Defects and Folate: Case Far from Closed. *Nat Rev Neurosci* **7**, 724-731.
- Bourgis, F., Roje, S., Nuccio, M.L., Fisher, D.B., Tarczynski, M.C., Li, C., Herschbach, C., Rennenberg, H., Pimenta, M.J., Shen, T.L., Gage, D.A., and Hanson, A.D.** (1999). S-Methylmethionine Plays a Major Role in Phloem Sulfur Transport and Is Synthesized by a Novel Type of Methyltransferase. *Plant Cell* **11**, 1485-1498.

**Bourguignon, J., Rebeille, F., and Douce, R.** (1999). Serine and Glycine Metabolism in Higher Plants. *Plant amino acids*, 111-146.

**Bozzo, G.G., Basset, G.J., Naponelli, V., Noiriél, A., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2008). Characterization of the Folate Salvage Enzyme P-Aminobenzoylglutamate Hydrolase in Plants. *Phytochemistry* **69**, 29-37.

**Bradford, M.M.** (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

**Brookes, P.S., and Baggott, J.E.** (2002). Oxidation of 10-Formyltetrahydrofolate to 10-Formyldihydrofolate by Complex Iv of Rat Mitochondria. *Biochemistry* **41**, 5633-5636.

**Brouwer, I., and Verhoef, P.** (2007). Folic Acid Fortification: Is Masking of Vitamin B-12 Deficiency What We Should Really Worry About? *Am J Clin Nutr* **86**, 897-898.

**Buryanov, Y.I., and Shevchuk, T.V.** (2005). DNA Methyltransferases and Structural-Functional Specificity of Eukaryotic DNA Modification. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 730-742.

**Cengel, A., and Sahinarslan, A.** (2006). Nitric Oxide and Cardiovascular System. *Anadolu Kardiyol Derg* **6**, 364-368.

**Cheng, Z., Sattler, S., Maeda, H., Sakuragi, Y., Bryant, D.A., and DellaPenna, D.** (2003). Highly Divergent Methyltransferases Catalyze a Conserved Reaction in Tocopherol and Plastoquinone Synthesis in Cyanobacteria and Photosynthetic Eukaryotes. *Plant Cell* **15**, 2343-2356.

**Chiba, Y., Ishikawa, M., Kijima, F., Tyson, R.H., Kim, J., Yamamoto, A., Nambara, E., Leustek, T., Wallsgrove, R.M., and Naito, S.** (1999). Evidence for Autoregulation of Cystathionine Gamma-Synthase Mrna Stability in Arabidopsis. *Science* **286**, 1371-1374.

**Choi, S.W., and Mason, J.B.** (2002). Folate Status: Effects on Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *J Nutr* **132**, 2413S-2418S.

**Cody, V., Galitsky, N., Luft, J.R., Pangborn, W., Rosowsky, A., and Blakley, R.L.** (1997). Comparison of Two Independent Crystal Structures of Human Dihydrofolate Reductase Ternary Complexes Reduced with Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate and the Very Tight-Binding Inhibitor Pt523. *Biochemistry* **36**, 13897-13903.

**Cossins, E.A., and Chen, L.** (1997). Folates and One-Carbon Metabolism in Plants and Fungi. *Phytochemistry* **45**, 437-452.

**Cossins, E.** (2000). The Fascinating World of Folate and One-Carbon Metabolism. *Can. J. Bot.-Rev. Can. Bot.* **78**, 691-708.

**Coxon, K.M., Chakauya, E., Ottenhof, H.H., Whitney, H.M., Blundell, T.L., Abell, C., and Smith, A.G.** (2005). Pantothenate Biosynthesis in Higher Plants. *Biochem Soc Trans* **33**, 743-746.

- Curien, G., Job, D., Douce, R., and Dumas, R.** (1998). Allosteric Activation of Arabidopsis Threonine Synthase by S-Adenosylmethionine. *Biochemistry* **37**, 13212-13221.
- Curien, G., Ravanel, S., and Dumas, R.** (2003). A Kinetic Model of the Branch-Point between the Methionine and Threonine Biosynthesis Pathways in Arabidopsis Thaliana. *Eur J Biochem* **270**, 4615-4627.
- Curien, G., Biou, V., Mas-Droux, C., Robert-Genthon, M., Ferrer, J.L., and Dumas, R.** (2008). Amino Acid Biosynthesis: New Architectures in Allosteric Enzymes. *Plant Physiol Biochem* **46**, 325-339.
- De Paepe, A., and Van der Straeten, D.** (2005). Ethylene Biosynthesis and Signaling: An Overview. *Plant Hormones* **72**, 399-430.
- Delcamp, T.J., Susten, S.S., Blankenship, D.T., and Freisheim, J.H.** (1983). Purification and Characterization of Dihydrofolate-Reductase from Methotrexate-Resistant Human-Lymphoblastoid Cells. *Biochemistry* **22**, 633-639.
- DeSouza, L., Shen, Y., and Bognar, A.L.** (2000). Disruption of Cytoplasmic and Mitochondrial Folylpolylglutamate Synthetase Activity in Saccharomyces Cerevisiae. *Arch Biochem Biophys* **376**, 299-312.
- Dias, B., and Weimer, B.** (1998). Purification and Characterization of L-Methionine Gamma-Lyase from Brevibacterium Linens B12. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3327-3331.
- Diaz de la Garza, R.I., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2007). Folate Biofortification of Tomato Fruit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4218-4222.
- Donaldson, K.O., and Keresztesy, J.C.** (1962). Naturally Occurring Forms of Folic Acid .3. Characterization and Properties of 5-Methyl-dihydrofolate, an Oxidation Product of 5-Methyltetrahydrofolate. *Journal of Biological Chemistry* **237**, 3815-&.
- Douce, R., and Neuburger, M.** (1999). Biochemical Dissection of Photorespiration. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 214-222.
- Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M., and Rebeille, F.** (2001). The Glycine Decarboxylase System: A Fascinating Complex. *Trends Plant Sci* **6**, 167-176.
- Droux, M., Ravanel, S., and Douce, R.** (1995). Methionine Biosynthesis in Higher Plants. Ii. Purification and Characterization of Cystathionine Beta-Lyase from Spinach Chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* **316**, 585-595.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R.** (2003). Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science* **300**, 455.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for Pcr Analysis. *Nucleic Acids Research* **19**, 1349-1349.
- Eichholzer, M., Tonz, O., and Zimmermann, R.** (2006). Folic Acid: A Public-Health Challenge. *Lancet* **367**, 1352-1361.

**Eudes, A., Bozzo, G.G., Waller, J.C., Naponelli, V., Lim, E.K., Bowles, D.J., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2008). Metabolism of the Folate Precursor P-Aminobenzoate in Plants: Glucose Ester Formation and Vacuolar Storage. *J Biol Chem* **283**, 15451-15459.

**Ferchichi, M., Hemme, D., and Bouillanne, C.** (1986). Influence of Oxygen and Ph on Methanethiol Production from L-Methionine by *Brevibacterium Linens* Cnrz 918. *Appl Environ Microbiol* **51**, 725-729.

**Freemantle, S.J., Taylor, S.M., Krystal, G., and Moran, R.G.** (1995). Upstream Organization of and Multiple Transcripts from the Human Folylpoly-Gamma-Glutamate Synthetase Gene. *J Biol Chem* **270**, 9579-9584.

**Gambonnet, B., Jabrin, S., Ravanel, S., Karan, M., Douce, R., and Rebeille, F.** (2001). Folate Distribution During Higher Plant Development. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**, 835-841.

**Ganesan, K., Ponmee, N., Jiang, L., Fowble, J.W., White, J., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Wilairat, P., and Rathod, P.K.** (2008). A Genetically Hard-Wired Metabolic Transcriptome in *Plasmodium Falciparum* Fails to Mount Protective Responses to Lethal Antifolates. *Plos Pathogens* **4**.

**Gazziola, C., Ferraro, P., Moras, M., Reichard, P., and Bianchi, V.** (2001). Cytosolic High K-M 5'-Nucleotidase and 5'(3')-Deoxyribonucleotidase in Substrate Cycles Involved in Nucleotide Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 6185-6190.

**Gelling, C.L., Piper, M.D.W., Hong, S.P., Kornfeld, G.D., and Dawes, I.W.** (2004). Identification of a Novel One-Carbon Metabolism Regulon in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 7072-7081.

**Giglione, C., and Meinel, T.** (2001). Organellar Peptide Deformylases: Universality of the N-Terminal Methionine Cleavage Mechanism. *Trends Plant Sci* **6**, 566-572.

**Goto, D.B., Onouchi, H., and Naito, S.** (2005). Dynamics of Methionine Biosynthesis. *Plant Biotechnology* **22**, 379-388.

**Goubet, F., Council, L.N., and Mohnen, D.** (1998). Identification and Partial Characterization of the Pectin Methyltransferase "Homogalacturonan-Methyltransferase" from Membranes of Tobacco Cell Suspensions. *Plant Physiology* **116**, 337-347.

**Goyer, A., Illarionova, V., Roje, S., Fischer, M., Bacher, A., and Hanson, A.D.** (2004). Folate Biosynthesis in Higher Plants. Cdna Cloning, Heterologous Expression, and Characterization of Dihydroneopterin Aldolases. *Plant Physiol* **135**, 103-111.

**Goyer, A., Collakova, E., Diaz de la Garza, R., Quinlivan, E.P., Williamson, J., Gregory, J.F., 3rd, Shachar-Hill, Y., and Hanson, A.D.** (2005). 5-Formyltetrahydrofolate Is an Inhibitory but Well Tolerated Metabolite in *Arabidopsis* Leaves. *J Biol Chem* **280**, 26137-26142.

**Gregory, J.F., 3rd, and Quinlivan, E.P.** (2002). In Vivo Kinetics of Folate Metabolism. *Annu Rev Nutr* **22**, 199-220.

- Grillo, M.A., and Colombatto, S.** (2005). S-Adenosylmethionine and Protein Methylation. *Amino Acids* **28**, 357-362.
- Hacham, Y., Avraham, T., and Amir, R.** (2002). The N-Terminal Region of Arabidopsis Cystathionine Gamma-Synthase Plays an Important Regulatory Role in Methionine Metabolism. *Plant Physiology* **128**, 454-462.
- Hanson, A.D., Gage, D.A., and Shachar-Hill, Y.** (2000). Plant One-Carbon Metabolism and Its Engineering. *Trends Plant Sci* **5**, 206-213.
- Hayashi, I., Sohn, K.J., Stempak, J.M., Croxford, R., and Kim, Y.I.** (2007). Folate Deficiency Induces Cell-Specific Changes in the Steady-State Transcript Levels of Genes Involved in Folate Metabolism and 1-Carbon Transfer Reactions in Human Colonic Epithelial Cells. *Journal of Nutrition* **137**, 607-613.
- Herbig, K., Chiang, E.P., Lee, L.R., Hills, J., Shane, B., and Stover, P.J.** (2002). Cytoplasmic Serine Hydroxymethyltransferase Mediates Competition between Folate-Dependent Deoxyribonucleotide and S-Adenosylmethionine Biosyntheses. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 38381-38389.
- Holmquist, M.** (2000). Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms. *Curr Protein Pept Sci* **1**, 209-235.
- Howles, P.A., Birch, R.J., Collings, D.A., Gebbie, L.K., Hurley, U.A., Hocart, C.H., Arioli, T., and Williamson, R.E.** (2006). A Mutation in an Arabidopsis Ribose 5-Phosphate Isomerase Reduces Cellulose Synthesis and Is Rescued by Exogenous Uridine. *Plant J* **48**, 606-618.
- Hubner, R.A., and Houlston, R.S.** (2009). Folate and Colorectal Cancer Prevention. *Br J Cancer* **100**, 233-239.
- Ifergan, I., and Assaraf, Y.G.** (2008). Molecular Mechanisms of Adaptation to Folate Deficiency. *Folic Acid and Folates* **79**, 99-143.
- Inaba, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Chino, M., Komeda, Y., and Naito, S.** (1994). Isolation of an Arabidopsis Thaliana Mutant, Mto1, That Overaccumulates Soluble Methionine (Temporal and Spatial Patterns of Soluble Methionine Accumulation). *Plant Physiol* **104**, 881-887.
- Ishikawa, T., Machida, C., Yoshioka, Y., Kitano, H., and Machida, Y.** (2003). The Globular Arrest1 Gene, Which Is Involved in the Biosynthesis of Folates, Is Essential for Embryogenesis in Arabidopsis Thaliana. *Plant J* **33**, 235-244.
- Jabrin, S., Ravel, S., Gambonnet, B., Douce, R., and Rebeille, F.** (2003). One-Carbon Metabolism in Plants. Regulation of Tetrahydrofolate Synthesis During Germination and Seedling Development. *Plant Physiol* **131**, 1431-1439.
- Jacques, P.F., Selhub, J., Bostom, A.G., Wilson, P.W., and Rosenberg, I.H.** (1999). The Effect of Folic Acid Fortification on Plasma Folate and Total Homocysteine Concentrations. *N Engl J Med* **340**, 1449-1454.

**James, S.J., Basnakian, A.G., and Miller, B.J.** (1994). In-Vitro Folate-Deficiency Induces Deoxynucleotide Pool Imbalance, Apoptosis, and Mutagenesis in Chinese-Hamster Ovary Cells. *Cancer Research* **54**, 5075-5080.

**Johnson, A.E., Esmon, N.L., Laue, T.M., and Esmon, C.T.** (1983). Structural-Changes Required for Activation of Protein-C Are Induced by Ca-2+ Binding to a High-Affinity Site That Does Not Contain Gamma-Carboxyglutamic Acid. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 5554-5560.

**Johnson, W.G., Stenroos, E.S., Spychala, J.R., Chatkupt, S., Ming, S.X., and Buyske, S.** (2004). New 19 Bp Deletion Polymorphism in Intron-1 of Dihydrofolate Reductase (Dhfr): A Risk Factor for Spina Bifida Acting in Mothers During Pregnancy? *Am J Med Genet A* **124A**, 339-345.

**Julliard, J.H.** (1994). Purification and Characterization of Oxopantoyl Lactone Reductase from Higher Plants : Role in Panthteante Synthesis. *Bot. Acta* **107**, 191-200.

**Kang, S.S., Wong, P.W., and Malinow, M.R.** (1992). Hyperhomocyst(E)Inemia as a Risk Factor for Occlusive Vascular Disease. *Annu Rev Nutr* **12**, 279-298.

**Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I., and Tachibana, S.** (2004). Overexpression of Spermidine Synthase Enhances Tolerance to Multiple Environmental Stresses and up-Regulates the Expression of Various Stress-Regulated Genes in Transgenic Arabidopsis Thaliana. *Plant Cell Physiol* **45**, 712-722.

**Kikuchi, G., Motokawa, Y., Yoshida, T., and Hiraga, K.** (2008). Glycine Cleavage System: Reaction Mechanism, Physiological Significance, and Hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **84**, 246-263.

**King, H.L., and Wilken, D.R.** (1972). Studies of Alpha-Ketopantoyl Lactone and Alpha-Ketopantoic Acid Reductases of Yeast. *Federation Proceedings* **31**, A476-&.

**Kirke, P.N., Mills, J.L., Molloy, A.M., Brody, L.C., O'Leary, V.B., Daly, L., Murray, S., Conley, M., Mayne, P.D., Smith, O., and Scott, J.M.** (2004). Impact of the Mthfr C677t Polymorphism on Risk of Neural Tube Defects: Case-Control Study. *Bmj* **328**, 1535-1536.

**Klaus, S.M., Wegkamp, A., Sybesma, W., Hugenholtz, J., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2005a). A Nudix Enzyme Removes Pyrophosphate from Dihydroneopterin Triphosphate in the Folate Synthesis Pathway of Bacteria and Plants. *J Biol Chem* **280**, 5274-5280.

**Klaus, S.M., Kunji, E.R., Bozzo, G.G., Noiriél, A., de la Garza, R.D., Basset, G.J., Ravel, S., Rebeille, F., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2005b). Higher Plant Plastids and Cyanobacteria Have Folate Carriers Related to Those of Trypanosomatids. *J Biol Chem* **280**, 38457-38463.

**Kocsis, M.G., Ranocha, P., Gage, D.A., Simon, E.S., Rhodes, D., Peel, G.J., Mellema, S., Saito, K., Awazuhara, M., Li, C., Meeley, R.B., Tarczynski, M.C., Wagner, C., and Hanson, A.D.** (2003). Insertional Inactivation of the Methionine S-Methyltransferase Gene Eliminates the S-Methylmethionine Cycle and Increases the Methylation Ratio. *Plant Physiol* **131**, 1808-1815.



**Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The Promoter of T1-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector. *Molecular & General Genetics* **204**, 383-396.

**Li, R., Moore, M., and King, J.** (2003). Investigating the Regulation of One-Carbon Metabolism in Arabidopsis Thaliana. *Plant Cell Physiol* **44**, 233-241.

**Li, S., Arning, E., Liu, C., Vitvitsky, V., Hernandez, C., Banerjee, R., Bottiglieri, T., and Lin, J.D.** (2009). Regulation of Homocysteine Homeostasis through the Transcriptional Coactivator Pgc-1alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E543-548.

**Liang, P.H., and Anderson, K.S.** (1998). Substrate Channeling and Domain-Domain Interactions in Bifunctional Thymidylate Synthase-Dihydrofolate Reductase. *Biochemistry* **37**, 12195-12205.

**Lockwood, B.C., and Coombs, G.H.** (1991). Purification and Characterization of Methionine Gamma-Lyase from Trichomonas Vaginalis. *Biochem J* **279 ( Pt 3)**, 675-682.

**Lucock, M.D., Priestnall, M., Daskalakis, I., Schorah, C.J., Wild, J., and Levene, M.I.** (1995). Nonenzymatic Degradation and Salvage of Dietary-Folate - Physicochemical Factors Likely to Influence Bioavailability. *Biochemical and Molecular Medicine* **55**, 43-53.

**Luo, M., Orsi, R., Patrucco, E., Pancaldi, S., and Cella, R.** (1997). Multiple Transcription Start Sites of the Carrot Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Gene, and Sub-Cellular Localization of the Bifunctional Protein. *Plant Mol Biol* **33**, 709-722.

**MacFarlane, A.J., Liu, X.W., Perry, C.A., Flodby, P., Allen, R.H., Stabler, S.P., and Stover, P.J.** (2008). Cytoplasmic Serine Hydroxymethyltransferase Regulates the Metabolic Partitioning of Methylene tetrahydrofolate but Is Not Essential in Mice. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 25846-25853.

**Mainguet, S.E., Gakiere, B., Majira, A., Pelletier, S., Bringel, F., Guerard, F., Caboche, M., Berthome, R., and Renou, J.P.** (2009). Uracil Salvage Is Necessary for Early Arabidopsis Development. *Plant J.*

**Mattson, M.P.** (2003). Gene-Diet Interactions in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders. *Ann Intern Med* **139**, 441-444.

**McGuire, J.J., and Bertino, J.R.** (1981). Enzymatic Synthesis and Function of Polyglutamates. *Mol Cell Biochem* **38 Spec No**, 19-48.

**McGuire, J.J.** (2003). Anticancer Antifolates: Current Status and Future Directions. *Curr Pharm Des* **9**, 2593-2613.

**McKinnon, P.J., and Caldecott, K.W.** (2007). DNA Strand Break Repair and Human Genetic Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**, 37-55.

**Melnyk, S., Pogribna, M., Miller, B.J., Basnakian, A.G., Pogribny, I.P., and James, S.J.** (1999). Uracil Misincorporation, DNA Strand Breaks, and Gene Amplification Are Associated

with Tumorigenic Cell Transformation in Folate Deficient/Repleted Chinese Hamster Ovary Cells. *Cancer Letters* **146**, 35-44.

**Meuth, M.** (1989). The Molecular Basis of Mutations Induced by Deoxyribonucleoside Triphosphate Pool Imbalances in Mammalian Cells. *Exp Cell Res* **181**, 305-316.

**Moffatt, B.A., and Weretilnyk, E.A.** (2001). Sustaining S-Adenosyl-L-Methionine-Dependent Methyltransferase Activity in Plant Cells. *Physiologia Plantarum* **113**, 435-442.

**Mouillon, J.M., Aubert, S., Bourguignon, J., Gout, E., Douce, R., and Rebeille, F.** (1999). Glycine and Serine Catabolism in Non-Photosynthetic Higher Plant Cells: Their Role in C1 Metabolism. *Plant J* **20**, 197-205.

**Mouillon, J.M., Ravanel, S., Douce, R., and Rebeille, F.** (2002). Folate Synthesis in Higher-Plant Mitochondria: Coupling between the Dihydropterin Pyrophosphokinase and the Dihydropterolate Synthase Activities. *Biochem J* **363**, 313-319.

**Mudd, S.H., and Datko, A.H.** (1986). Methionine Methyl Group Metabolism in Lemna. *Plant Physiol* **81**, 103-114.

**Nardini, M., and Dijkstra, B.W.** (1999). Alpha/Beta Hydrolase Fold Enzymes: The Family Keeps Growing. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 732-737.

**Neuburger, M., Rebeille, F., Jourdain, A., Nakamura, S., and Douce, R.** (1996). Mitochondria Are a Major Site for Folate and Thymidylate Synthesis in Plants. *J Biol Chem* **271**, 9466-9472.

**Niwa, Y.** (2003). A Synthetic Green Fluorescent Protein Gene for Plant Biotechnology. *Plant Biotechnology* **20**, 1-11.

**Noiriel, A., Naponelli, V., Bozzo, G.G., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2007). Folate Salvage in Plants: Pterin Aldehyde Reduction Is Mediated by Multiple Non-Specific Aldehyde Reductases. *Plant J* **51**, 378-389.

**Nour, J.M., and Rabinowitz, J.C.** (1991). Isolation, Characterization, and Structural Organization of 10-Formyltetrahydrofolate Synthetase from Spinach Leaves. *J Biol Chem* **266**, 18363-18369.

**Nour, J.M., and Rabinowitz, J.C.** (1992). Isolation and Sequencing of the Cdna Coding for Spinach 10-Formyltetrahydrofolate Synthetase. Comparisons with the Yeast, Mammalian, and Bacterial Proteins. *J Biol Chem* **267**, 16292-16296.

**Nzila, A.** (2006). Inhibitors of De Novo Folate Enzymes in Plasmodium Falciparum. *Drug Discov Today* **11**, 939-944.

**Oganesyan, N., Ankoudinova, I., Kim, S.H., and Kim, R.** (2007). Effect of Osmotic Stress and Heat Shock in Recombinant Protein Overexpression and Crystallization. *Protein Expression and Purification* **52**, 280-285.

- Ohmae, E., Tatsuta, M., Abe, F., Kato, C., Tanaka, N., Kunugi, S., and Gekko, K.** (2008). Effects of Pressure on Enzyme Function of Escherichia Coli Dihydrofolate Reductase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1784**, 1115-1121.
- Ominato, K., Akita, H., Suzuki, A., Kijima, F., Yoshino, T., Yoshino, M., Chiba, Y., Onouchi, H., and Naito, S.** (2002). Identification of a Short Highly Conserved Amino Acid Sequence as the Functional Region Required for Posttranscriptional Autoregulation of the Cystathionine Gamma-Synthase Gene in Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**, 36380-36386.
- Onouchi, H., Nagami, Y., Haraguchi, Y., Nakamoto, M., Nishimura, Y., Sakurai, R., Nagao, N., Kawasaki, D., Kadokura, Y., and Naito, S.** (2005). Nascent Peptide-Mediated Translation Elongation Arrest Coupled with Mrna Degradation in the Cgs1 Gene of Arabidopsis. *Genes Dev* **19**, 1799-1810.
- Orsomando, G., de la Garza, R.D., Green, B.J., Peng, M., Rea, P.A., Ryan, T.J., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2005). Plant Gamma-Glutamyl Hydrolases and Folate Polyglutamates: Characterization, Compartmentation, and Co-Occurrence in Vacuoles. *J Biol Chem* **280**, 28877-28884.
- Orsomando, G., Bozzo, G.G., de la Garza, R.D., Basset, G.J., Quinlivan, E.P., Naponelli, V., Rebeille, F., Ravanel, S., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2006). Evidence for Folate-Salvage Reactions in Plants. *Plant J* **46**, 426-435.
- Paik, W.K., Paik, D.C., and Kim, S.** (2007). Historical Review: The Field of Protein Methylation. *Trends Biochem Sci* **32**, 146-152.
- Pereira, L.A.R., Todorova, M., Cai, X., Makaroff, C.A., Emery, R.J.N., and Moffatt, B.A.** (2007). Methyl Recycling Activities Are Co-Ordinately Regulated During Plant Development. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1083-1098.
- Phan, J., Steadman, D.J., Koli, S., Ding, W.C., Minor, W., Dunlap, R.B., Berger, S.H., and Lebioda, L.** (2001). Structure of Human Thymidylate Synthase Suggests Advantages of Chemotherapy with Noncompetitive Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 14170-14177.
- Piccicchi, A., Douce, R., and Alban, C.** (2001). Biochemical Characterization of the Arabidopsis Biotin Synthase Reaction. The Importance of Mitochondria in Biotin Synthesis. *Plant Physiol* **127**, 1224-1233.
- Pokorny, R., Klar, T., Essen, L.O., and Batschauer, A.** (2005). Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Cryptochrome 3 from Arabidopsis Thaliana. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61**, 935-938.
- Prabhu, V., Chatson, K.B., Abrams, G.D., and King, J.** (1996). <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Detection of Interactions of Serine Hydroxymethyltransferase with C1-Tetrahydrofolate Synthase and Glycine Decarboxylase Complex Activities in Arabidopsis. *Plant Physiol* **112**, 207-216.

- Prabhu, V., Chatson, K.B., Lui, H., Abrams, G.D., and King, J.** (1998). Effects of Sulfanilamide and Methotrexate on 13c Fluxes through the Glycine Decarboxylase/Serine Hydroxymethyltransferase Enzyme System in Arabidopsis. *Plant Physiol* **116**, 137-144.
- Prowse, A.H., Vanderveer, L., Milling, S.W.F., Pan, Z.Z., Dunbrack, R.L., Xu, X.X., and Godwin, A.K.** (2002). Ovca2 Is Downregulated and Degraded During Retinoid-Induced Apoptosis. *International Journal of Cancer* **99**, 185-192.
- Quevillon-Cheruel, S., Leulliot, N., Graille, M., Hervouet, N., Coste, F., Benedetti, H., Zelwer, C., Janin, J., and Van Tilbeurgh, H.** (2005). Crystal Structure of Yeast Yhr049w/Fsh1, a Member of the Serine Hydrolase Family. *Protein Science* **14**, 1350-1356.
- Quinlivan, E.P., McPartlin, J., Weir, D.G., and Scott, J.** (2000). Mechanism of the Antimicrobial Drug Trimethoprim Revisited. *Faseb J* **14**, 2519-2524.
- Quinlivan, E.P., Roje, S., Basset, G., Shachar-Hill, Y., Gregory, J.F., 3rd, and Hanson, A.D.** (2003). The Folate Precursor P-Aminobenzoate Is Reversibly Converted to Its Glucose Ester in the Plant Cytosol. *J Biol Chem* **278**, 20731-20737.
- Raman, S.B., and Rathinasabapathi, B.** (2004). Pantothenate Synthesis in Plants. *Plant Science* **167**, 961-968.
- Ranocha, P., Bourgis, F., Ziemak, M.J., Rhodes, D., Gage, D.A., and Hanson, A.D.** (2000). Characterization and Functional Expression of Cdnas Encoding Methionine-Sensitive and -Insensitive Homocysteine S-Methyltransferases from Arabidopsis. *J Biol Chem* **275**, 15962-15968.
- Ranocha, P., McNeil, S.D., Ziemak, M.J., Li, C., Tarczynski, M.C., and Hanson, A.D.** (2001). The S-Methylmethionine Cycle in Angiosperms: Ubiquity, Antiquity and Activity. *Plant J* **25**, 575-584.
- Ravel, S., Job, D., and Douce, R.** (1996). Purification and Properties of Cystathionine Beta-Lyase from Arabidopsis Thaliana Overexpressed in Escherichia Coli. *Biochem J* **320 ( Pt 2)**, 383-392.
- Ravel, S., Gakiere, B., Job, D., and Douce, R.** (1998a). Cystathionine Gamma-Synthase from Arabidopsis Thaliana: Purification and Biochemical Characterization of the Recombinant Enzyme Overexpressed in Escherichia Coli. *Biochem J* **331 ( Pt 2)**, 639-648.
- Ravel, S., Gakiere, B., Job, D., and Douce, R.** (1998b). The Specific Features of Methionine Biosynthesis and Metabolism in Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7805-7812.
- Ravel, S., Cherest, H., Jabrin, S., Grunwald, D., Surdin-Kerjan, Y., Douce, R., and Rebeille, F.** (2001). Tetrahydrofolate Biosynthesis in Plants: Molecular and Functional Characterization of Dihydrofolate Synthetase and Three Isoforms of Folylpolyglutamate Synthetase in Arabidopsis Thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15360-15365.
- Ravel, S., Block, M.A., Rippert, P., Jabrin, S., Curien, G., Rebeille, F., and Douce, R.** (2004). Methionine Metabolism in Plants: Chloroplasts Are Autonomous for De Novo

Methionine Synthesis and Can Import S-Adenosylmethionine from the Cytosol. *J Biol Chem* **279**, 22548-22557.

**Rebeille, F., Neuburger, M., and Douce, R.** (1994). Interaction between Glycine Decarboxylase, Serine Hydroxymethyltransferase and Tetrahydrofolate Polyglutamates in Pea Leaf Mitochondria. *Biochem J* **302** ( Pt 1), 223-228.

**Rebeille, F., Macherel, D., Mouillon, J.M., Garin, J., and Douce, R.** (1997). Folate Biosynthesis in Higher Plants: Purification and Molecular Cloning of a Bifunctional 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin Pyrophosphokinase/7,8-Dihydropteroate Synthase Localized in Mitochondria. *Embo J* **16**, 947-957.

**Rebeille, F., and Douce, R.** (1999). Folate Synthesis and Compartmentation in Higher Plants. Regulation of Primary Metabolic Pathways in Plants.

**Rebeille, F., Jabrin, S., Bligny, R., Loizeau, K., Gambonnet, B., Van Wilder, V., Douce, R., and Ravanel, S.** (2006). Methionine Catabolism in Arabidopsis Cells Is Initiated by a Gamma-Cleavage Process and Leads to S-Methylcysteine and Isoleucine Syntheses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15687-15692.

**Rebeille, F., Alban, C., Bourguignon, J., Ravanel, S., and Douce, R.** (2007). The Role of Plant Mitochondria in the Biosynthesis of Coenzymes. *Photosynth Res* **92**, 149-162.

**Reichard, P.** (1988). Interactions between Deoxyribonucleotide and DNA-Synthesis. *Annual Review of Biochemistry* **57**, 349-374.

**Rognes, S.E., Wallsgrove, R.M., Kueh, J.S.H., and Bright, S.W.J.** (1986). Effects of Exogenous Amino-Acids on Growth and Activity of 4 Aspartate Pathway Enzymes in Barley. *Plant Science* **43**, 45-50.

**Roje, S., Wang, H., McNeil, S.D., Raymond, R.K., Appling, D.R., Shachar-Hill, Y., Bohnert, H.J., and Hanson, A.D.** (1999). Isolation, Characterization, and Functional Expression of Cdnas Encoding Nadh-Dependent Methylenetetrahydrofolate Reductase from Higher Plants. *J Biol Chem* **274**, 36089-36096.

**Roje, Z., Karanovic, N., and Utrobicic, I.** (2006). Abdominoplasty Complications: A Comprehensive Approach for the Treatment of Chronic Seroma with Pseudobursa. *Aesthetic Plast Surg* **30**, 611-615.

**Sahr, T., Ravanel, S., and Rebeille, F.** (2005). Tetrahydrofolate Biosynthesis and Distribution in Higher Plants. *Biochem Soc Trans* **33**, 758-762.

**Saze, H.** (2008). Epigenetic Memory Transmission through Mitosis and Meiosis in Plants. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 527-536.

**Schmidt, A., Rennenberg, H., Wilson, L.G., and Filner, P.** (1985). Formation of Methanethiol from Methionine by Leaf Tissue. *Phytochemistry* **24**, 1181-1185.

**Schormann, N., Senkovich, O., Walker, K., Wright, D.L., Anderson, A.C., Rosowsky, A., Ananthan, S., Shinkre, B., Velu, S., and Chattopadhyay, D.** (2008). Structure-Based

Approach to Pharmacophore Identification, in Silico Screening, and Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Studies for Inhibitors of Trypanosoma Cruzi Dihydrofolate Reductase Function. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **73**, 889-901.

**Schroder, G., Eichel, J., Breinig, S., and Schroder, J.** (1997). Three Differentially Expressed S-Adenosylmethionine Synthetases from Catharanthus Roseus: Molecular and Functional Characterization. *Plant Mol Biol* **33**, 211-222.

**Schultz, D.C., Vanderveer, L., Berman, D.B., Hamilton, T.C., Wong, A.J., and Godwin, A.K.** (1996). Identification of Two Candidate Tumor Suppressor Genes on Chromosome 17p13.3. *Cancer Research* **56**, 1997-2002.

**Shannon, K.W., and Rabinowitz, J.C.** (1986). Purification and Characterization of a Mitochondrial Isozyme of C1-Tetrahydrofolate Synthase from Saccharomyces Cerevisiae. *J Biol Chem* **261**, 12266-12271.

**Smithells, R.W., Sheppard, S., and Schorah, C.J.** (1976). Vitamin Deficiencies and Neural Tube Defects. *Arch Dis Child* **51**, 944-950.

**Song, J.M., and Rabinowitz, J.C.** (1993). Function of Yeast Cytoplasmic C1-Tetrahydrofolate Synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2636-2640.

**Storozhenko, S., De Brouwer, V., Volckaert, M., Navarrete, O., Blancquaert, D., Zhang, G.F., Lambert, W., and Van Der Straeten, D.** (2007a). Folate Fortification of Rice by Metabolic Engineering. *Nat Biotechnol* **25**, 1277-1279.

**Storozhenko, S., Navarrete, O., Ravel, S., De Brouwer, V., Chaerle, P., Zhang, G.F., Bastien, O., Lambert, W., Rebeille, F., and Van Der Straeten, D.** (2007b). Cytosolic Hydroxymethyldihydropterin Pyrophosphokinase/Dihydropteroate Synthase from Arabidopsis Thaliana: A Specific Role in Early Development and Stress Response. *J Biol Chem* **282**, 10749-10761.

**Stover, P., and Schirch, V.** (1993). The Metabolic Role of Leucovorin. *Trends Biochem Sci* **18**, 102-106.

**Strong, W.B., Tandler, S.J., Seither, R.L., Goldman, I.D., and Schirch, V.** (1990). Purification and Properties of Serine Hydroxymethyltransferase and C1-Tetrahydrofolate Synthase from L1210 Cells. *J Biol Chem* **265**, 12149-12155.

**Suh, J.R., Herbig, A.K., and Stover, P.J.** (2001). New Perspectives on Folate Catabolism. *Annu Rev Nutr* **21**, 255-282.

**Sulewska, A., Niklinska, W., Kozłowski, M., Minarowski, L., Naumnik, W., Niklinski, J., Dabrowska, K., and Chyczewski, L.** (2007). DNA Methylation in States of Cell Physiology and Pathology. *Folia Histochem Cytobiol* **45**, 149-158.

**Tahiliani, A.G., and Beinlich, C.J.** (1991). Pantothenic Acid in Health and Disease. *Vitam Horm* **46**, 165-228.

- Tchanchou, F., and Shea, T.B.** (2008). Folate Deprivation, the Methionine Cycle, and Alzheimer's Disease. *Vitam Horm* **79**, 83-97.
- Thompson, G.A., Datko, A.H., and Mudd, S.H.** (1982). Methionine Synthesis in Lemna: Inhibition of Cystathionine Gamma-Synthase by Propargylglycine. *Plant Physiol* **70**, 1347-1352.
- Trabetti, E.** (2008). Homocysteine, Mthfr Gene Polymorphisms, and Cardio-Cerebrovascular Risk. *J Appl Genet* **49**, 267-282.
- Vance, D.E., and Walkey, C.J.** (1998). Roles for the Methylation of Phosphatidylethanolamine. *Curr Opin Lipidol* **9**, 125-130.
- Werner-Felmayer, G., Golderer, G., and Werner, E.R.** (2002). Tetrahydrobiopterin Biosynthesis, Utilization and Pharmacological Effects. *Curr Drug Metab* **3**, 159-173.
- Williams, L.J., Mai, C.T., Edmonds, L.D., Shaw, G.M., Kirby, R.S., Hobbs, C.A., Sever, L.E., Miller, L.A., Meaney, F.J., and Levitt, M.** (2002). Prevalence of Spina Bifida and Anencephaly During the Transition to Mandatory Folic Acid Fortification in the United States. *Teratology* **66**, 33-39.
- Yang, Q., Bostick, R.M., Friedman, J.M., and Flanders, W.D.** (2009). Serum Folate and Cancer Mortality among U.S. Adults: Findings from the Third National Health and Nutritional Examination Survey Linked Mortality File. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 1439-1447.
- Zaim, J., Speina, E., and Kierzek, A.M.** (2005). Identification of New Genes Regulated by the Crt1 Transcription Factor, an Effector of the DNA Damage Checkpoint Pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 28-37.
- Zhang, X.R., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., and Chua, N.H.** (2006). Agrobacterium-Mediated Transformation of *Arabidopsis Thaliana* Using the Floral Dip Method. *Nature Protocols* **1**, 641-646.
- Zhong, R., Iii, W.H., Negrel, J., and Ye, Z.H.** (1998). Dual Methylation Pathways in Lignin Biosynthesis. *Plant Cell* **10**, 2033-2046.
- Zhu, T., Koepsel, R., Ataai, M., and Domach, M.M.** (2002). Metabolic Engineering of *B. Subtilis* for Folic Acid Manufacturing. Abstracts of Papers of the American Chemical Society **224**, 117-BIOT.
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U., and Boldt, R.** (2006). Pyrimidine and Purine Biosynthesis and Degradation in Plants. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 805-836.

## PUBLICATIONS ET CONGRES

### Articles dans des revues internationales

1 • RÉBEILLÉ F, JABRIN S, BLIGNY R, **LOIZEAU K**, GAMBONNET B, VAN WILDER V, DOUCE R, RAVANEL S. (2006)<sup>1</sup>. Methionine catabolism in Arabidopsis cells is initiated by a gamma-cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 42: 15687-92. IF 9.64<sup>1</sup>

2 • **LOIZEAU K**, GAMBONNET B, ZHANG GF, CURIEN G, JABRIN S, VAN DER STRAETEN D, LAMBERT WE, RÉBEILLÉ F, RAVANEL S. (2007). Regulation of one-carbon metabolism in Arabidopsis: the N-terminal regulatory domain of cystathionine gamma-synthase is cleaved in response to folate starvation. *Plant Physiol.*, 145: 491-503. IF 6.36

3 • NAPONELLI V, NOIRIEL A, ZIEMAK MJ, BEVERLEY SM, LYE LF, PLUME AM, BOTELLA JR, **LOIZEAU K**, RAVANEL S, RÉBEILLÉ F, DE CRÉCY-LAGARD V, HANSON AD (2008). Phylogenomic and functional analysis of pterin-4a-carbinolamine dehydratase family (COG2154) proteins in plants and microorganisms. *Plant Physiol.*, 146: 1515-27. IF 6.36 (2007)

4 • **LOIZEAU K**, DE BROUWER V, GAMBONNET B, YU A, RENOU JP, VAN DER STRAETEN D, LAMBERT WE, RÉBEILLÉ F, RAVANEL S. (2008). A genome-wide and metabolic analysis determined the adaptive response of Arabidopsis cells to folate depletion induced by methotrexate. *Plant Physiol.*, 148: 2083-95. IF 6.36 (2007)

5 • VAN WILDER V, DE BROUWER V, **LOIZEAU K**, GAMBONNET B, ALBRIEUX C, VAN DER STRAETEN D, LAMBERT WE, DOUCE R, BLOCK MA, REBEILLE F, RAVANEL S. (2009). C1 metabolism and chlorophyll synthesis: the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity is dependent on the folate status. *New Phytol.*, 182: 137-145. IF 5.25 (2007)

6 • BLANCQUAERT D, STOROZHENKO S, **LOIZEAU K**, DE STEUR H, DE BROUWER V, VIAENE J, RAVANEL S, REBEILLE F, LAMBERT W, VAN DER STRAETEN D. (2009). Folates and folic acid: from fundamental research towards sustainable health. *Crit Rev Plant Sci*. In press. IF 6.20 (2008).

---

<sup>1</sup> Les facteurs d'impact indiqués sont ceux de l'année de publication de l'article (ou de l'année la plus proche le cas échéant).



## **Participations à des congrès**

7° Colloque général de la Société Française de Biologie Végétale. Versailles, 2007.

• **LOIZEAU K**, GAMBONNET B, ZHANG GF, CURIEN G, JABRIN S, VAN DER STRAETEN D, LAMBERT WE, REBEILLE F, RAVANEL S. Folate-dependant post-translational regulation of methionine synthesis in plants (**conférence**, sélection sur résumé).

Plant Genomics and Beyond. Evry, 2009.

• **LOIZEAU K**, DE BROUWER V, GAMBONNET B, YU A, RENOUE JP, VAN DER STRAETEN D, LAMBERT WE, REBEILLE F, RAVANEL S. A Genome-wide and metabolic analysis determined the response of Arabidopsis cells to folate depletion induced by methotrexate (poster).

## RESUME

Les dérivés du tétrahydrofolate (THF), plus connus sous le nom de folate(s) ou vitamine B9, sont des cofacteurs indispensables au métabolisme cellulaire puisqu'ils sont à la base des réactions de transfert d'unités monocarbonées, regroupées sous le terme de "métabolisme C1". Chez tous les organismes, ces réactions sont impliquées dans des processus cellulaires clés comme la synthèse des nucléotides (purines, thymidylate), la synthèse de certains acides aminés (sérine, glycine, méthionine) et, indirectement, dans la synthèse de S-adénosylméthionine. Cette dernière constitue le donneur universel de groupements méthyles et intervient donc dans l'ensemble des réactions de méthylation. Les plantes, les champignons et certains micro-organismes possèdent la capacité de réaliser la synthèse *de novo* de THF alors que les animaux en sont incapables et sont contraints de puiser cette vitamine dans leur alimentation.

Lors du développement de la plante, la capacité de synthèse du THF, le pool global et la nature des folates ainsi que la demande en unités C1 varient de façon importante. Pourtant, la littérature reste succincte en ce qui concerne les mécanismes qui permettent de contrôler l'homéostasie en folates en fonction des besoins fluctuants en unités C1 de la plante et sur la manière dont sont distribuées ces unités entre les différentes voies utilisatrices.

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse a permis de mettre en évidence différents niveaux de régulation du métabolisme C1 permettant à la plante de répondre à une diminution du pool de folates. Ainsi, l'étude transcriptomique de la réponse de cellules d'*Arabidopsis* à un traitement par un antifolate, le méthotrexate, a révélé une absence de processus de compensation de la baisse de la quantité de folates puisque les gènes impliqués dans la synthèse, le transport et la dégradation du THF ne présentent pas de modification de leur expression. La régulation transcriptionnelle mise en place suite à une limitation en folates concerne un nombre restreint de gènes qui vont influencer la composition en dérivés du THF et non l'abondance de ce cofacteur vitaminique. En effet, alors qu'en situation physiologique le flux d'unités C1 alimente majoritairement les réactions de méthylation, il se trouve que le déficit en folates provoque une réorientation de ce flux vers la synthèse des nucléotides.

La diminution des méthylations cellulaires en situation de déficit en folates a été illustrée lors de l'étude d'une méthyltransférase particulière qui intervient dans la synthèse des chlorophylles, la Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase. Des feuilles de pois déficientes en folates présentent une forte diminution de l'index de méthylation qui se traduit par une régulation métabolique de l'activité de la Mg-protoporphyrine IX méthyltransférase, conduisant ainsi à une baisse de la synthèse des chlorophylles. Cette étude démontre que le statut en folates influence, *via* les réactions de méthylations, des processus physiologiques essentiels comme la biogenèse de l'appareil photosynthétique.

Ce travail de thèse a également mis en évidence un mécanisme de régulation post-traductionnelle de la synthèse de méthionine en situation de carence en folates. Ce mécanisme consiste en un clivage protéolytique de l'extrémité N-terminale de la première enzyme dédiée à la synthèse de méthionine, la cystathionine  $\gamma$ -synthase. L'élimination de ce domaine régulateur de l'enzyme permet, par un mécanisme encore inconnu, d'accroître la biosynthèse de méthionine en situation de déficit en folates.

## **ABSTRACT**

Tetrahydrofolate (THF) derivatives, collectively termed folates or vitamin B9, are involved in almost all the metabolic processes that require the addition or removal of one-carbon units (C1 metabolism). C1-substituted folate coenzymes are thus involved in several major cellular processes, including the synthesis of nucleotides (purines and thymidylate) and amino acids (methionine, serine, glycine). Methionine serves as a methyl group donor through conversion to *S*-adenosylmethionine, the key biological methylating agent involved in dozens methyltransferase reactions. Plants, fungi and most micro-organisms are able to synthesize THF *de novo* whereas humans and animals in general lack this capacity and thus rely on dietary intake of vitamin B9.

During plant development, the enzymatic capacity for THF synthesis, the pool of folates, and the demands for C1-units vary importantly. However, little is known about how folate homeostasis is controlled to match the supply of C1-units, and how C1-units are accurately distributed between the different anabolic routes. In this work, we identified different regulatory mechanisms that allow plants to respond to a limitation of the folate pool.

First, we analyzed the genome-wide and metabolic response of *Arabidopsis* cells to folate depletion induced by the antifolate methotrexate. Surprisingly, no significant change in the expression of genes involved in cofactor synthesis, degradation or trafficking was observed. One major response to folate limitation concerned the composition of the cofactor pool. Thus, the transcriptional regulation of a limited number of genes coding enzymes manipulating C1-moieties in plastids was associated with a re-orientation of C1-units towards the synthesis of purines and thymidylate. These data suggest that the metabolic priority of *Arabidopsis* cells in response to folate limitation is to shuttle the available folate derivatives to the synthesis of nucleotides at the expense of methylation reactions.

Second, because the efficiency of methylation reactions are likely affected by folate depletion, we investigated the relationships between the folate status, the methyl cycle activity, and the rate of chlorophyll synthesis, which relies at one step on a methylation reaction catalyzed by Mg protoporphyrin IX methyltransferase. Etiolated pea leaves treated with methotrexate displayed a reduced folate pool and a marked decrease in the methyl index. This resulted in a metabolic regulation (inhibition) of the Mg-protoporphyrin IX methyltransferase activity and to a decreased rate of chlorophyll synthesis. These results point out that an even moderate change in the folate status may affect essential physiological processes such as chloroplast biogenesis.

Last, the analysis of *Arabidopsis* cells exposed to a long-term folate starvation revealed an original post-translational regulation of methionine synthesis. This process consists in the proteolytic cleavage of the N-terminal domain of cystathionine  $\gamma$ -synthase, the first specific enzyme for methionine synthesis. We suggest that an effector, to date unidentified, can modulate enzyme activity *in vivo* through an interaction with the N-terminal domain and that removal of this domain in folate-deficient cells can suppress this regulation.